

**UNIVERSIDADE DA REGIÃO DE JOINVILLE - UNIVILLE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM SAÚDE E MEIO AMBIENTE**

SILMARA BRIETZIG HENNRICH

**PAPEL PROTETOR DE ANTIOXIDANTES CLÁSSICOS SOBRE O
DANO OXIDATIVO SANGUÍNEO EM RATOS CAUSADO PELA
GALACTOSEMIA CLÁSSICA**

Joinville

2016

SILMARA BRIETZIG HENNRICH

**PAPEL PROTETOR DE ANTIOXIDANTES CLÁSSICOS SOBRE O
DANO OXIDATIVO SANGUÍNEO EM RATOS CAUSADO PELA
GALACTOSEMIA CLÁSSICA**

Dissertação de mestrado apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre em Saúde e Meio Ambiente, na Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE.

Orietadora: Prof^a. Dr^a. Daniela Delwing de Lima.

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Débora Delwing Dal Magro

Joinville

2016

Catálogo na publicação pela Biblioteca Universitária da Univille

Hennrich, Silmara Brietzig
H515pPapel protetor de antioxidantes clássicos sobre o dano oxidativo sanguíneo em ratos causado pela galactosemia clássica/Silmara Brietzig Hennrich; orientadora Dra. Daniela Delwing de Lima, co-orientadora Dra. Débora Delwing Dal Magro— Joinville: UNIVILLE, 2016.

86f.:il.; 30 cm

Dissertação (Mestrado em Saúde e Meio Ambiente
—Universidade da Região de Joinville)

1. Metabolismo. — Distúrbios. 2. Galactosemia. 3. Antioxidantes.
4. Estresse oxidativo. I. Lima, Daniela Delwing de (orient.). II. Dal Magro, Débora Delwing (co-orient.). III. Título.

CDD612.39


Termo de Aprovação


“Papel Protetor de Antioxidantes Clássicos sobre o dano Oxidativo Sanguíneo em Ratos causado pela Galactosemia Clássica”


por

Silmara Brietzig


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


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



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

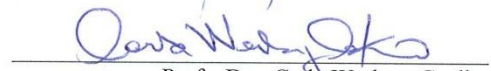

Prof. Dra. Therezinha Maria Novais de Oliveira
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente

Banca Examinadora:


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


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


Prof. Dra. Ana Lúcia Bertarello Zeni
(FURB)


Prof. Dra. Carla Werlang Coelho
(UNIVILLE)

Joinville, 26 de fevereiro de 2016

Dedico este trabalho a minha família, pela paciência, compreensão e parceria durante toda esta trajetória.

AGRADECIMENTOS

Em especial agradeço a Deus, pela oportunidade de existência neste mundo, pelos caminhos traçados pelas bênçãos de todos os dias para enfrentar todos os obstáculos no caminho desta jornada.

Também agradeço de todo coração e de forma muitíssimo especial a minha orientadora Prof^a Dr^a. Daniela Delwing de Lima, que com certeza sem você esta etapa da minha vida não seria possível, gostaria de deixar aqui registrada a minha eterna gratidão e o meu sincero OBRIGADO por tudo, pela paciência, compreensão, apoio e incentivo, pelos sorrisos e conversas e permitir que eu pudesse compartilhar de alguns dias de sua vida conhecendo-a como a pessoa maravilhosa que és. Que Deus te abençoe sempre.

Agradeço em especial à minha família, aos meus filhos Yago Felipe, Vinícius e Isadora, por compreender os momentos de ausência e muitas vezes em momentos especiais de suas vidas, OBRIGADO. Ao meu amado marido Ivan, que com paciência, e carinho, sempre com palavras para me incentivar a seguir a diante porque valeria à pena, AMO VOCÊS!

Deixo aqui o meu agradecimento aos meus pais Norberto e Nilza Maria Brietzig pelo apoio e carinho que tiveram durante toda esta etapa e por me mostrarem de alguma forma para nunca desistir. Obrigado pela educação que me deram, pois sem ela nada disso seria possível.

Agradeço a todos os meus irmãos, mas destacando em especial Carlos Eduardo, Rogério, Rafael, Cassiano e Sidnei que estiveram envolvidos nesse processo, meu muito obrigado. Amo todos vocês.

Não podia deixar de agradecer enormemente ao Sr. Dr^o. David J. Timson, ao qual disponibilizou informações importantes de suas pesquisas para que este trabalho fosse concluído, deixo aqui registrado meu enorme e sincero MUITO OBRIGADO!

Ao meu amigo Gilivã Fridrich, Rosane Waltrick e Patrícia Acosta pelos momentos de companheirismo, pelas risadas, pelos momentos de ombro amigo e pela alegria de vê-los também concluir etapas importantes de sua vida. Obrigado

As queridas colaboradoras dos laboratórios da Univille, Leticia Dalmedico, Juliana Gruenwaldt Maia Aurélio, Ana Paula Serpa, que muito fizeram para a obtenção das análises, obrigado pela dedicação, carinho, paciência . A ajuda de vocês foi essencial para o desenvolvimento deste trabalho. Obrigado por toda a dedicação.

Ao professor Eduardo, pela disponibilidade e apoio. A todos os professores do mestrado, pelos grandes ensinamentos.

A secretária do mestrado Débora Nunes Pinheiro Gesser, pela ajuda, dedicação e atenção.

Também deixo aqui meu agradecimento a CAPES, UNIVILLE e FAPESC, pelo apoio a pesquisa

MEU MUITO OBRIGADO A TODOS!!

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem vitória, nem derrota.”

(Theodore Roosevelt)

Resumo

Na presente investigação foram avaliados os efeitos *in vitro* de diferentes concentrações de galactose sobre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) e o conteúdo total de sulfidrilas em plasma, sobre a atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutatona peroxidase (GSH-Px) em eritrócitos e sobre a atividade da enzima butirilcolinesterase (BuChE) em soro de ratos. Também avaliamos a influência dos antioxidantes trolox, vitamina C (ácido ascórbico) e glutatona sobre as alterações causadas pela galactose nos parâmetros avaliados. Foram utilizados ratos machos Wistar de 30 e 60 dias de idade, não tratados. A galactose foi adicionada ao ensaio a fim de se obter as seguintes concentrações finais: 0,1, 3,0, 5,0 e 10,0 mM. O grupo controle foi realizado sem a adição da galactose. Para os experimentos *in vitro*, o plasma e eritrócitos dos ratos foram divididos nos seguintes grupos: grupo 1 (controle-salina), grupo 2 (galactose), grupo 3 (controle-trolox 1,0 mM), grupo 4 (controle-ácido ascórbico 1,0 mM), grupo 5 (controle-glutatona 1,0 mM), grupo 6 (galactose + trolox 1,0 mM), grupo 7 (galactose + ácido ascórbico 1,0 mM) e grupo 8 (galactose + glutatona 1,0 mM). Após a adição dos compostos descritos acima, os tubos de ensaio foram incubados por 1 hora a temperatura de 37°C. As doses de trolox, ácido ascórbico e glutatona seguiram os protocolos descritos por Wyse et al. (2002), Silva et al. (2004) e Avrova et al. (1999), respectivamente. Os resultados mostraram que a galactose nas concentrações de 3,0 mM, 5,0 mM e 10,0 mM aumentou TBA-RS em plasma ratos de 60 dias de idade e na concentração de 10,0 mM reduziu o conteúdo total de sulfidrilas em plasma de ratos de 30 dias de idade. Com relação as enzimas antioxidantes, a galactose nas concentrações de 5,0 mM e 10,0 mM aumentou significativamente a atividade da CAT em eritrócitos de ratos de 30 e 60 dias de idade e na concentração de 10,0 mM reduziu a atividade da SOD em eritrócitos de ratos de 60 dias de idade, porém não alterou a atividade da GSH-Px em eritrócitos de ratos de 30 e 60 dias de idade. A galactose não alterou a atividade da enzima BuChE em soro de ratos de 30 e 60 dias de idade. Os antioxidantes foram capazes de prevenir a maioria das alterações causadas pela galactose. Os dados sugerem que a galactose causa peroxidação lipídica, verificada pelo aumento em TBA-RS; dano em proteínas, uma vez que a galactose causou oxidação de grupos sulfidrilas; e alterações na atividade de enzimas antioxidantes. Os resultados sugerem que os radicais livres estão provavelmente envolvidos nos efeitos pró-oxidantes da galactose, uma vez que os antioxidantes trolox, ácido ascórbico e glutatona impediram muitas das alterações causadas pela galactose no sangue de ratos. Os presentes dados sugerem fortemente que um desequilíbrio na homeostase redox ocorre nesta doença. Além disso, os resultados reforçam dados de apoio a estruturar uma estratégia terapêutica adjuvante, com base em antioxidantes, para limitar o dano oxidativo causado pela galactose na Galactosemia Clássica.

Palavras-chave: Galactosemia; estresse oxidativo; antioxidantes; butirilcolinesterase, ratos.

Abstract

In the present study we evaluated the in vitro effects of different galactose concentrations of the substances reactive to thiobarbituric acid (TBARS) and the total content of sulfhydryl in plasma, on the activity of antioxidant enzymes catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) in erythrocytes and the enzyme activity of butyrylcholinesterase (BuChE) in rat serum. We also evaluated the influence of trolox antioxidants, vitamin C (ascorbic acid) and glutathione on the changes caused by galactose in the evaluated parameters. Wistar male rats were used 30 and 60 day old untreated. Galactose was added to the test to obtain the following final concentrations: 0.1, 3.0, 5.0 and 10.0 mM. The control group was made without the addition of galactose. For in vitro experiments, the plasma and erythrocytes of rats were divided into four groups: group 1 (control-saline), group 2 (galactose), group 3 (control-trolox 1.0 mM), group 4 (control ascorbic acid 1, 0 mM), group 5 (control-glutathione 1.0 mM), group 6 (galactose + trolox 1.0 mM), group 7 (galactose + ascorbic acid 1.0 mM) and group 8 (galactose + glutathione 1, 0 mM). After the addition of the above compounds, the assay tubes were incubated for 1 hour at 37 °C. Doses of Trolox and ascorbic acid and glutathione followed the protocols described by Wyse et al. (2002), Smith et al. (2004) and Avrova et al. (1999), respectively. The results showed that the galactose concentrations (3.0 mM, 5.0 mM and 10.0 mM) increased TBA-RS in plasma rats 60 days old and at a concentration of 10.0 mM reduced total content sulfhydryl at 30 day old rat plasma. Regarding the antioxidant enzymes galactose in concentrations of 5.0 mM and 10.0 mM significantly increased CAT activity in erythrocytes of mice 30 to 60 days old and at a concentration of 10.0 mM reduced SOD activity in erythrocytes mice 60 days of age but did not alter the activity of GSH-Px at 30 and 60 days old rat erythrocytes. The galactose did not affect the enzyme activity of BuChE in mouse serum 30 and 60 days of age. The antioxidants were able to prevent the majority of the changes induced by galactose. The data suggest that galactose cause lipid peroxidation, verified by the increase in TBA-RS; damage to proteins, since galactose caused oxidation of sulfhydryl groups; and changes in the activity of antioxidant enzymes. The results suggest that free radicals are probably involved in pro-oxidant effects of galactose, as the antioxidant trolox, ascorbic acid and glutathione prevent many of the changes induced by galactose in rat blood. The present data strongly suggests that an imbalance in redox homeostasis occurs in this disease. In addition, the results reinforce data supporting structure an adjuvant therapeutic strategy, based on antioxidants to limit oxidative damage caused by galactose in Classic Galactosemia.

Keywords: galactosemia; oxidative stress; antioxidants; butyrylcholinesterase rats.

LISTA DE FIGURAS REFERÊNCIAL TEÓRICO

Figura 1-	Processo de metabolismo da galactose.....	21
Figura 2-	Formação do Radical Livre partindo de uma molécula estável para uma molécula instável.....	25
Figura 3-	Espécies Reativas de Oxigênio (ERO).....	27
Figura 4-	Formação de Radicais Livres.....	28
Figura 5-	Mecanismo de início e propagação da lipoperoxidação.....	30
Figura 6-	Antioxidantes X Radicais Livres.....	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

8-OHdG	8-hidroxideoxiguanosina
AChe	Acetilcolinesterase
BuChe	Butirilcolinesterase
CAT	Catalase
Cu²⁺	Íon cobre
DMH	Doenças metabólicas hereditárias
DNA	Ácido desoxirribonucléico
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EIM	Erro Inato do Metabolismo
ERO	Espécies reativas de oxigênio
Fe²⁺	Íon Ferro
GALE	uridina-difosfogalactose 4-epimerase
GALK	Galactoquinase
GALT	galactose fosfato uridil transferase
GSH	Glutationa
GSH-Px	Glutationa Peroxidase
L•	Radical lipídico
LOO•	Radical peroxila
LOOH	Hidroperóxidos
LPO	Lipoperoxidação
NO	Óxido nítrico
NO•	Nitroxila
NO⁺	Nitrosônio

NOS	Óxido nítrico sintase
O₂	Oxigenio
O₂H₂	Peróxido dde hidrogênio
OH	Radical Hidroxila
RNA	Ácido ribonucléico
SOD	Superóxido dismutase
TBAR-RS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
UDP	Uridila difosfato

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS REFERENCIAL TEÓRICO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 OBJETIVOS.....	20
2.1 Objetivo geral.....	20
2.2 Objetivos específicos.....	20
3 REVISÃO.....	21
3.1 Erros inatos do metabolismo.....	21
3.2 Galactosemia.....	22
3.3 Galactosemia Clássica.....	23
3.4 Radicais Livres.....	26
3.5 Estresse Oxidativo.....	29
3.5.1 Causas dos danos celulares por estresse oxidativo.....	31
3.5.1.1 <i>Peroxidação lipídica.....</i>	<i>31</i>
3.5.1.2 <i>Danos sobre as proteínas</i>	<i>32</i>
3.5.1.3 <i>Danos no DNA.....</i>	<i>33</i>
3.6 Agentes antioxidantes X Atividade antioxidantes.....	34

3.7 Enzimas antioxidantes.....	37
3.7.1 Superóxido Dismutase (SOD).....	37
3.7.2 Catalase (CAT).....	37
3.7.3 Glutaciona Peroxidase (GSH-Px).....	37
3.8 Antioxidantes exógenos	37
3.8.1 Ácido ascórbico (Vitamina C).....	37
3.8.2 Alfa-tocoferol (Vitamina E).....	38
3.8.3 Glutaciona.....	38
3.9 Colinesterase.....	39
4 METODOLOGIA.....	41
4.1 Animais.....	41
4.2 Protocolo experimental.....	41
4.2.1 Estudo <i>in vitro</i>	41
4.2.2 Prevenção com trolox, ácido ascórbico e glutaciona.....	42
4.3 Estudos bioquímicos.....	42
4.3.1 Preparação dos eritrócitos e do plasma para determinação de parâmetros de estresse oxidativo.....	42
4.3.2 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS).....	43
4.3.3 Catalase (CAT).....	43
4.3.4 Glutaciona Peroxidase (GSH-Px).....	43
4.3.5 Superóxido dismutase (SOD).....	43
4.3.6 Conteúdo total de sulfidrilas	44
4.3.7 Ensaio da atividade da butirilcolinesterase (BuChe).....	44
4.3.8 Dosagem de proteínas	44

4.4 Análise estatística.....	44
5 REFERENCIAS.....	45
6 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	61
6.1 Artigo 1 - GALACTOSE CAUSES OXIDATIVE STRESS IN THE BLOOD OF RATS: PROTECTION BY ANTIOXIDANTS.....	61
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	86

1 INTRODUÇÃO

Os Erros Inatos do Metabolismo (EIM) constituem um grupo heterogêneo de defeitos genéticos que afetam a síntese, degradação, processamento e transporte de moléculas no organismo, que podem levar ao acúmulo de substâncias, em deficiência de produtos intermediários críticos produtos finais específicos ou ainda no excesso das mesmas (MC CORVIE & TIMSON, 2011).

A galactosemia clássica é umas das diversas forma EIM, considerada a mais comum das galactosemias, sendo uma doença caracterizada pela deficiência na atividade da enzima galactose-1-fosfato uridiltransferase (GALT), a qual está envolvida no metabolismo da galactose (Isselbacher, 1956; Leloir, 1951). A enzima galactose-1-fosfato uridiltransferase (GALT) catalisa a conversão reversível da UDP-glicose e galactose -1- fosfato a UDP- galactose e glicose -1- fosfato (FREY et al., 1982; MC CORVIE & TIMSON, 2011).

Podem ser caracterizada duas outras formas de galactosemia, a galactosemia tipo II (GALK, EC 2.7.1.6), caracterizada por deficiência na enzima galactoquinase, a qual fosforila a galactose produzindo galactose-1-fosfato e a galactosemia tipo III (GALE), caracterizada por deficiência na enzima UDP-galactose-4'-epimerase, a qual interconverte UDP-galactose e UDP-glicose (HOLDEN et al., 2003; THODEN et al., 2005; TIMSON, 2006).

Os sintomas iniciais apresentados por pacientes galactosêmicos são geralmente inespecíficos, como dificuldade de alimentação, vômitos e diarreia, letargia e hipotonia, doença hepática e sepses predominantemente por *Escherichia coli* podendo levar à morte precoce crianças não tratadas (HOLTAN et al., 2001). Crianças afetadas também apresentam risco maior de atraso no desenvolvimento, dificuldades de fala e deficiência intelectual. Indivíduos do sexo feminino podem ter problemas reprodutivos causados por insuficiência ovariana (Bosch 2006). A galactosemia também causa desordens oftálmicas como catarata, que foi descrita como o principal achado oftálmico nessa doença, também há relatos de hemorragia vítrea, a qual é raramente observada (LEVY et al., 1996).

O período inicial da doença pode ocorrer *in útero*, pois o desenvolvimento das vias metabólicas da galactose inicia aproximadamente no período da 10ª

semana de gestação. Mas, é somente após o início da ingestão de leite, que se dará o início das manifestações caracterizado pela forma aguda e fulminante, associada à sepsis neonatal por *E. coli*. No entanto, a forma mais frequente é a sub-aguda, fase que apresenta como sintomas: vômito, diarreia, icterícia, hepatomegalia, ascite, aumento plasmático de fenilalanina e tirosina, galactosúria, aumento de galactose-1-fosfato plasmática, entre outros (VÁSQUEZ, 2007). Apesar da dieta restrita em galactose, ocorrem complicações tardias que podem ter origem na produção endógena de galactose, resultante da reciclagem de hidratos de carbono complexos, assim como da possível quebra de UDP - galactose (SEGAL et al, 1995; VÁSQUEZ, 2007).

Quanto ao diagnóstico, a galactosemia clássica pode ser detectada através da triagem neonatal, como ocorre em muitos países desenvolvidos, minimizando a patologia aguda (Jumbo-Lucioniet al., 2012). O diagnóstico e o tratamento da galactosemia deve ser realizado o mais precoce possível, a fim de evitar a morte neonatal e para minimizar complicações posteriores (BOSCH, 2006).

O estresse oxidativo tem atraído à atenção da comunidade científica nas últimas décadas, uma vez que estudos indicam que este está envolvido no mecanismo de muitas doenças, incluindo câncer, aterosclerose, envelhecimento, diabetes tipo 2 e doenças neurodegenerativas, como Alzheimer e doença de Parkinson (Jezek e Hlavatá, 2005). Além disso, o estresse oxidativo é comumente observado em alguns erros inatos do metabolismo intermediário, participando de sua fisiopatologia (COLOME et al, 2000; DELWING et al., 2005; DELWING et al., 2006; DELWING et al., 2007; WAJNER et al, 2004). Embora a causa do estresse oxidativo aumentado nestas doenças não esteja completamente compreendida, pode ser devido ao acúmulo de metabólitos tóxicos que levam à produção excessiva de radicais livres ou à depleção celular de defesas antioxidantes (ARTUCH et al ., 2004; VAN BACKEL et al, 2000).

Considerando que a patogênese do quadro clínico característico apresentado por pacientes galactosemicos vem passando por diversos processos de pesquisas. Este trabalho tem por objetivo verificar o efeito *in vitro* de diferentes concentrações de galactose no plasma demonstrando os efeitos

sobre o TBA-RS e o conteúdo total de sulfidrilas e sobre as atividades das enzimas antioxidantes (catalase, glutathione peroxidase e superóxido dismutase) em eritrócitos e verificar o efeito *in vitro* de diferentes concentrações de galactose sobre a atividade da enzima butirilcolinesterase em soro de ratos de 30 e 60 dias.

Por fim, a proposta foi investigar a influência dos antioxidantes trolox, ácido ascórbico e glutathione sobre os efeitos *in vitro* da galactose, sobre o TBA-RS e sulfidrilas em plasma de ratos; atividade das enzimas antioxidantes (catalase, glutathione peroxidase e superóxido dismutase) em eritrócitos de ratos e a atividade da butirilcolinesterase em soro de ratos de 30 e 60 dias de idade.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Estudar os efeitos *in vitro* da galactose e a influência dos antioxidantes trolox, ácido ascórbico e glutathione sobre alguns parâmetros de estresse oxidativo e sobre a atividade da butirilcolinesterase em sangue de ratos de 30 e 60 dias de idade.

2.2 Objetivos específicos

- Verificar o efeito *in vitro* de diferentes concentrações de galactose (0,1mM, 3,0mM, 5,0mM e 10,0mM) sobre o TBA-RS e o conteúdo total de sulfidrilas em plasma de ratos de 30 e 60 dias de idade;
- Verificar o efeito *in vitro* de diferentes concentrações de galactose (0,1mM, 3,0mM, 5,0mM e 10,0mM) sobre a atividade das enzimas antioxidantes CAT, GSH-Px e SOD em eritrócitos de ratos de 30 e 60 dias de idade;
- Verificar o efeito *in vitro* de diferentes concentrações de galactose sobre a atividade da enzima BuChE em soro de ratos de 30 e 60 dias;
- Investigar a influência *in vitro* dos antioxidantes trolox, ácido ascórbico e glutathione sobre os efeitos da galactose sobre o TBA-RS e conteúdo total de sulfidrilas em plasma de ratos e atividade das enzimas antioxidantes CAT, GSH-Px e SOD em eritrócitos de ratos de 30 e 60 dias de idade.

3 REVISÃO

3.1 Erros inatos do metabolismo

As Doenças Metabólicas Hereditárias (DMH) estão sendo constantemente pesquisadas, entre elas os erros inatos do metabolismo (EIM), que tem a primeira descrição relatada aproximadamente um século, tempo este, que contribuiu para o progresso e avanço da ciência básica e da tecnologia, possibilitando maior conhecimento sobre a patogênese das DMH e, conseqüentemente, sobre o diagnóstico, manejo e tratamento destas patologias (SOUZA et al. 2006).

De acordo com Souza e colaboradores (2006), os EIM são doenças ou desordens metabólicas hereditárias que ocorrem devido a um defeito enzimático específico, que determina um bloqueio de uma via metabólica. Este bloqueio, por sua vez, ocasiona o acúmulo do substrato inicial, ou a deficiência do produto da reação, ou o desvio da rota metabólica com formação de outro produto final, podendo levar ao comprometimento dos processos celulares, o que é considerado de grande importância clínica, pois afetam a produção de energia ou lesam tecidos críticos para a sobrevivência.

Para Gimenez-Sanches Valle (2001) aproximadamente cerca de 500 EIMs foram identificados até o momento, correspondendo a cerca de 10% de todas as doenças genéticas. Ainda que individualmente raros, os EIMs são freqüentes em conjunto, apresentando uma incidência cumulativa estimada em 1:1.000 recém-nascidos vivos (GIUGLIANI; COELHO, 1997).

Quanto à classificação dos EIMs, essa depende da área metabólica que sofrerá alteração, podendo ser por diferentes vias metabólicas, como a de aminoácidos, ácido orgânicos, glicídios, lipídios, glicosaminoglicanos, glicoproteínas, purinas e pirimidinas, enzimas eritrocitárias, lipoproteínas, hormônios e proteínas plasmáticas (SCRIVER et al. 2001). O diagnóstico precoce é de extrema importância, pois resulta na diminuição significativa dos sintomas e impede o agravamento destes. Assim, a triagem neonatal é fundamental para o diagnóstico em fase pré-clínica, prevenindo o dano

neurológico e em alguns casos a morte do paciente (MARTINS et al. 2003; JARDIM; ASHTON-PROLLA, 1996; SOUZA, 2002).

Considerando o crescente impacto das doenças genéticas no Brasil, e a possibilidade de detecção precoce, acredita-se que cada país deva conhecer a frequência de doenças metabólicas a nível populacional e com isso promover a realização de estudos de custo e benefício, para decidir sobre a inclusão ou não dos testes diagnósticos e com isso possibilitar o tratamento e conseqüentemente a minimização dos sintomas e agravamento da doença (POLLITT; 1997).

3.2 Galactosemias

A galactosemia é uma doença metabólica rara, de fundo genético, é uma entidade mórbida de caráter autossômico, transmitida recessivamente. A deficiência de uma enzima do metabolismo da galactose não permite que esta seja transformada em glicose, principal fonte de energia do organismo e acaba resultando em acúmulo de metabólitos da galactose no organismo. O acúmulo da galactose ou de seus metabólitos é considerado a causa de danos aos rins, fígado, cérebro e olhos ou até mesmo a morte em casos mais graves (SEGAL; BERRY; 1995). A galactosemia é definida, como a deficiência no processo do metabolismo da galactose, na maioria dos casos, da enzima galactose-1-fosfato uridiltransferase, promovendo um acúmulo de galactose e de galactose-1-fosfato no sangue e nos tecidos.

De acordo com a via de Leloir, a deficiência de qualquer uma das 3 (três) enzimas envolvidas na metabolização da galactose (Figura 1) pode causar galactosemia, incluindo: deficiência da galactose 1-fosfato uridiltransferase (GALT), que causa a forma mais comum, também conhecida como "galactosemia clássica", deficiência da galactoquinase (GALK) e deficiência da uridina difosfato-galactose-4-epimerase (GALE) (TIMSON, 2015). As galactosemias são classificadas em: Tipo 1 ou deficiência da GALT, caracterizada como sendo o tipo mais comum de galactosemia, cuja deficiência está na enzima galactose-1-fosfato uridil transferase. Esta disfunção resulta no acúmulo de galactose 1-fosfato e impedimento na formação de

glicose-1-fosfato que entraria na glicogenólise. A galactosemia Tipo 2 ou deficiência da GALK, consiste em deficiência enzimática da galactoquinase, resultando no acúmulo de galactose, a qual pode ser convertida a galactitol de toxicidade elevada, ou galactonato que também é um produto tóxico. E por fim a galactosemia tipo 3 ou deficiência da GALE, a qual resulta na deficiência da enzima uridil difosfogalactose-4-epimerase, a qual interconverte UDP-galactose e UDP-glicose. Todas as formas de galactosemias podem causar danos severos à saúde do portador desta patologia (YAGER, 2003).

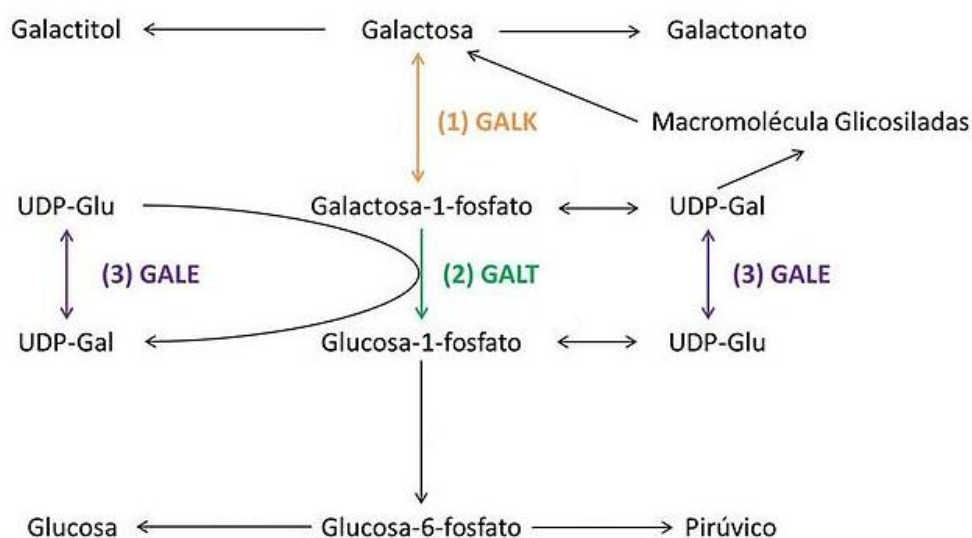


Figura 1: Processo de metabolismo da galactose. (Holden; Rayment; Thoden,2003).

3.3 Galactosemia Clássica

A galactosemia clássica (tipo I) é uma doença genética rara causada pela deficiência na atividade da enzima galactose-1-fosfato uridil transferase (GALT) (EC 2.7.7.12), a qual está envolvida no metabolismo da galactose (ISSELBACHER, 1956; LELOIR, 1951). Essa enzima catalisa a conversão reversível da UDP-glicose e galactose-1-fosfato a UDP-galactose e glicose-1-fosfato (FREY et al., 1982; MC CORVIE & TIMSON, 2011).

A forma mais comum e clinicamente grave da galactosemia é a galactosemia clássica, a qual afeta cerca de 1/30.000 a 60.000 nascidos vivos

(TYFIELD & WALTER, 2002; ZAFFANELLO et al, 2005). Algumas hipóteses têm sido sugeridas sobre a interferência da galactose-1-fosfato, acumulada na galactosemia, sobre a atividade de várias enzimas do metabolismo dos carboidratos (LAI et al., 2009). Dados da literatura mostram que tanto pacientes tratados como não tratados apresentam alterações de glicosilação (TYFIELD & WALTER, 2002; WALTER et al., 1999). De acordo com o estudo de Charlwood e colaboradores (1998), se observou alterações significativas de glicosilação mesmo em pacientes com restrição alimentar prolongada de galactose, sugerindo que a biossíntese das glicoproteínas e /ou glicolipídeos podem contribuir não só para a fase aguda, mas também para algumas das complicações a longo prazo. Em 1995, Gitzelmann sugeriu que o aumento intracelular de galactose-1-fosfato poderia inibir a atividade de várias enzimas, como por exemplo a atividade da glicose-6-fosfatase, fosfoglicomutase, glicogênio fosforilase hepática, UDP-glicose pirofosforilase e glicose-6-fosfatase desidrogenase.

Estudos realizados por Gitzelmann (1995) também mostraram que após restrição dietética de galactose, os pacientes com galactosemia clássica apresentaram valores de galactose-1-fosfato frequentemente fora do intervalo normal (>5mM em pacientes não tratados, 0,1mM em pacientes tratados, sendo esses valores indetectáveis em indivíduos saudáveis). Além disso, a literatura relata que altas concentrações de galactose-1-fosfato inibe o crescimento celular em levedura *Saccharomyces cerevisiae*, a qual é utilizada como um organismo modelo para estudo desta patologia (SLEPAK et al., 2005).

Embora a doença seja geralmente assintomática no momento do nascimento, os pacientes com esse EIM da galactose desenvolvem sintomas crescentes após a exposição a uma dieta à base de leite. Na ausência de intervenção, estes sintomas, citados anteriormente podem inclusive levar à morte neonatal. Os sintomas desta doença podem variar de leve a muito grave, incluindo disfunções crônicas, tais como retardo mental e, no sexo feminino, insuficiência ovariana (BOSCH, 2006; FRIDOVICH-KEIL, 2008).

A galactosemia clássica pode ser detectada através da triagem neonatal, em muitos países desenvolvidos, minimizando a patologia aguda (JUMBO-LUCIONI et al., 2012). O diagnóstico da galactosemia tipo I pode ser

estabelecido através do aumento dos níveis de galactose-1-fosfato e diminuição da atividade da GALT em eritrócitos (ELSAS, 1993). Dados da literatura mostram que a subtração de galactose da dieta do paciente é considerada o padrão atual de tratamento, porém não é suficiente uma vez que a galactose é também produzida endogenamente, através do “*turnover*” de glicolipídeos e glicoproteínas (LAI et al., 2009). No entanto, mesmo com a restrição dietética de galactose, muitos pacientes com galactosemia clássica podem vir a desenvolver complicações graves a longo prazo (HOLTON et al., 2000). Assim, a restrição dietética de galactose pode atenuar ou prevenir estas manifestações agudas, mas não parece prevenir a longo prazo complicações como insuficiência ovariana, disfunção do sistema nervoso central, incluindo dificuldades cognitivas, problemas de memória, mais lento processamento de informação geral, sintomas psiquiátricos e distúrbios da fala, complicações motoras como tremor e ataxia cerebelar, entre outros problemas (ELSAS, 2000; HUGHES et al., 2009; POTTER et al., 2008; RIDEL et al., 2005; SCHADEWALDT et al., 2010; WAISBREN et al., 2012). Além disso, estudos de neuroimagem confirmam pobre mielinização, atrofia cerebral em alguns pacientes, bem como anormalidades na captação de glicose em muitas regiões cerebrais (DUBROFF et al., 2008). De acordo com Antshel e colaboradores (2004) e Waggoner e colaboradores (1990), os achados clínicos mais comuns nessa patologia incluem voz e/ou deficiência cognitiva em 30-50% de todos os pacientes e insuficiência ovariana primária ou prematura em quase 85% dos pacientes do sexo feminino (ANTSHEL et al., 2004; WAGGONER et al., 1990). Outras complicações incluem doença atáxica neurológica, atraso de crescimento e diminuição da densidade óssea (TYFIELD E WALTER, 2002).

De acordo com o estudo realizado por Timsom (2015), a partir da década de 1970 as abordagens de biologia molecular foram aplicadas à galactosemia. As localizações cromossômicas e as sequências de DNA dos três genes foram determinadas, estruturas das proteínas e estudos bioquímicos têm demonstrado que a deficiência enzimática resulta muitas vezes de enrolamento incorreto e consequente instabilidade da proteína.

Estudos em modelo de estruturas celulares têm demonstrado que a redução na atividade da GALT ou GALE resulta em aumento do estresse oxidativo. Assim, depois de um século de progresso, é possível conceber

terapias melhoradas e traçar o caminho para reduzir a ação de intermediários potencialmente tóxicos, com o uso de algumas drogas antioxidantes com a proposta de reduzir o estresse oxidativo das células ou a utilização de proteínas ou conjunto de proteínas auxiliaadoras que têm por função principal assistir e promover o enrolamento adequado de cadeias polipeptídicas, quer as cadeias recém-sintetizadas nos ribossomas do retículo endoplasmático quer pós-traducionalmente durante o seu processo de translocação através das membranas intracelulares (TIMSON, 2006).

No ambiente celular existem várias classes dessas proteínas não relacionadas estruturalmente que se organizam formando redes cooperativas de vigilância e manutenção da conformação nativa de proteínas ou de indução da destruição de proteínas irregulares através da formação de corpos de inclusão e posterior degradação pelas proteases do sistema lisosomal ou proteossomal, podendo ser utilizadas com ação farmacológica para estabilizar as proteínas afetadas (CARDEAL, 2013).

3.4 Radicais livres

Segundo Ferreira e Matsubara (1997), citam que pesquisas foram e são realizadas com a finalidade de esclarecer o papel dos radicais livres em processos fisiopatológicos como envelhecimento, câncer, aterosclerose, inflamação e tentando também evidenciar esta correlação com as doenças genéticas.

O termo radical livre refere-se à molécula altamente reativa, nominadas como espécies reativas de oxigênio (ERO) que contêm número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica (Figura 2). As camadas eletrônicas de um elemento químico são denominadas K, L, M e N, e seus subníveis, s, p, d, f, sendo que estas camadas devem estar sempre emparelhadas. Quando o emparelhamento não ocorre com os elétrons da última camada, o desemparelhamento confere alta reatividade aos átomos ou moléculas, promovendo o fator conhecido como óxido-redução, portanto, os radicais livres provocam ou resultam das reações de óxido-redução (HALLIWELL, 1991; HALLIWELL, 1992; BARBOSA et al., 2008; VASCONSELOS et al., 2007).

Quando um radical livre não encontra outro para se ligar a fim de obter estabilidade, ele capta elétrons de outras moléculas saudáveis, transformando-as em outros radicais livres, iniciando uma reação em cadeia com dano celular caso não ocorra intervenção dos antioxidantes (NEDEL, 2005; BARROS, 2012).

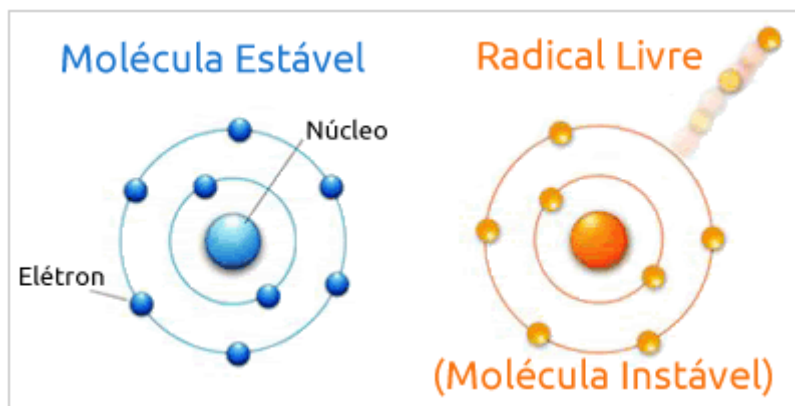


Figura 2- Formação do Radical Livre partindo de uma molécula estável para uma molécula instável – (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

Em sistemas biológicos, as ERO's representam a classe mais importante das espécies reativas (VALKO et al., 2006; MILLER et al., 1990). No metabolismo aeróbico, durante o processo que ocorre na cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria, o oxigênio molecular é reduzido à água após o recebimento de quatro elétrons, a fim de produzir energia na forma de adenosina trifosfato. Durante esse processo mitocondrial são produzidos intermediários reativos do O_2 que acabam escapando da mitocôndria podendo causar danos celulares. Quando a recuperação não pode ser feita pelas enzimas ou moléculas antioxidantes, esses intermediários podem oxidar biomoléculas como os ácidos graxos polinsaturados presentes na membrana celular plasmática ou nuclear (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

Os radicais livres mais tóxicos, ou seja, que geram maiores danos ao nosso organismo provém do oxigênio, e é o radical hidroxila ($OH\cdot$) e o radical superóxido, que consiste em dois átomos de oxigênio associados ($O_2\cdot^-$) com um único elétron não-pareado (HALLIWELL & GUITTERIDGE, 2000; PÓVOA, 1995; YOUNGSON, 1995).

Segundo Schneider e Oliveira (2004) e Sasso (2014), várias são as espécies reativas de oxigênio. Devido a sua configuração eletrônica, o O_2

durante a cadeia de transporte de elétrons apresenta forte tendência a receber um elétron de cada vez. Assim, com a adição de um elétron o O_2 gera o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) à partir do oxigênio ($O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\cdot-}$).

Através do processo de dismutação, o superóxido ao receber mais um elétron e dois íons de hidrogênio forma o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o O_2 ($2 O_2^{\cdot-} + 2H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$). Essa reação é catalisada pela enzima SOD (YU, 1994). O H_2O_2 apesar de não ser um radical livre, por não ter um elétron desemparelhado na sua última camada eletrônica, é uma espécie com alto potencial reativo. Diferente dos radicais livres, o H_2O_2 tem vida longa e é capaz de atravessar as membranas celulares apresentando-se potencialmente tóxico para as células. Esta toxicidade pode ser aumentada em dez mil vezes pela presença de íons ferro (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004).

Ao receber mais um elétron e um íon hidrogênio o H_2O_2 é transformado em radical hidroxil (OH^{\cdot}) que pode reagir e alterar qualquer estrutura celular que esteja próxima, influenciando enzimas, membranas ou ácidos nucléicos (JENKINS, 1988). O OH^{\cdot} também pode ser formado quando o H_2O_2 reage com íons de ferro ou cobre, reação denominada Reação de Fenton ($Fe^{2+}/Cu^+ + H_2O_2 \rightarrow OH^{\cdot} + OH^- + Fe^{3+}/Cu^{2+}$) (KOURY; DONANGELO, 2003; SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004).

Os íons de metais de transição também podem catalisar a reação entre H_2O_2 e superóxido, produzindo o OH^{\cdot} , esta reação é conhecida como Reação de Haber-Weiss ($O_2^{\cdot-} + H_2O_2 \longrightarrow O_2 + OH^- + OH^{\cdot}$) (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004). No estresse oxidativo o $O_2^{\cdot-}$ pode reagir com o óxido nítrico (NO), formando ânion peroxinitrito ($ONOO^-$), que é altamente reativo e prejudicial às biomoléculas. Posteriormente ocorre a formação do OH^{\cdot} ($O_2^{\cdot-} + NO \rightarrow ONO^-$; $ONOO^- + H^+ \rightarrow OH^{\cdot}$) (GREEN et al. 2004; SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004; SASSO 2014).

O NO, $ONOO^-$ juntamente com os íons nitrosênio (NO^+) e nitroxila (NO^-) são chamados de espécies reativas de nitrogênio (RNS) (BERGENDI et al. 1999). O NO é produzido a partir do aminoácido L-arginina por ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS) (ZHANG et al. 2006). De acordo com Wei e colegas (2003), o aumento nas concentrações de NO, em condições fisiopatológicas, pode causar lesão celular e conseqüentemente a formação de outros radicais

livres que causam dano oxidativo. Já o ONOO-, pode difundir-se para o meio intra ou extracelular, e então promover a oxidação de lipídeos, proteínas e DNA (BECKMAN, 1996).

Símbolo	Nome da EROS
OH⁰	Radical Hidroxila
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
O₂	Radical superóxido (anion superóxido)
RS⁰	Radical de enxofre central
CCl₃	Radical de carbono central
NO⁰	Óxido nítrico
HClO	Ácido hipocloroso
NO₃	Peroxinitrito

Figura 3 – Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) (Schneider, Oliveira 2004).

3.5 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é definido como uma condição metabólica na qual há um desequilíbrio entre os sistemas pró e antioxidante, nas reações de formação e remoção de radicais livres e/ou ERO, e também com relação aos compostos não radicais que são agentes oxidantes ou facilmente convertidos a radicais livres (Figura 2). Essa condição é capaz de intermediar diversos danos as células por meio da oxidação de biomoléculas como proteínas, lipídeos e DNA (VASCONSELOS et al., 2007; VALKO et al., 2005).

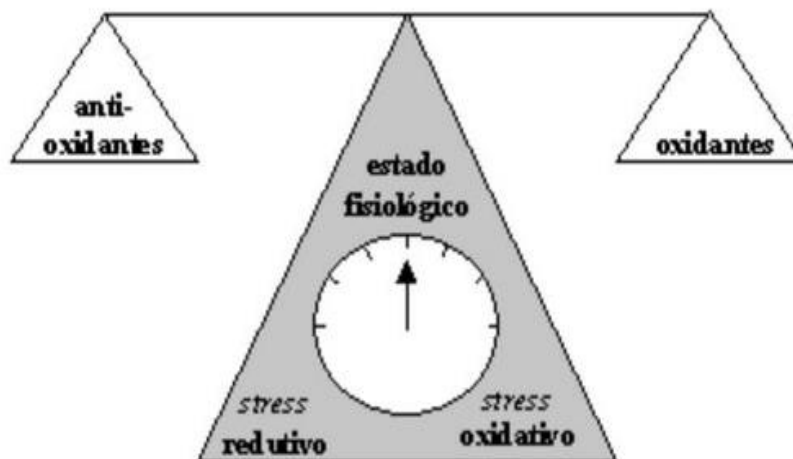


Figura 4: Formação de Radicais Livres. (Arreiros, David, David, 2006).

Segundo Valko et al. (2006), a produção de espécies reativas ocorre normalmente no organismo, pois diferentes funções fisiológicas utilizam reações de óxido-redução em vários processos do metabolismo. Por outro lado, o organismo conta com uma série de substâncias (enzimas e moléculas) cuja função é neutralizar essas espécies quando produzidas em excesso. O balanço sutil entre a produção e o consumo desses compostos é chamado de regulação redox. O estresse oxidativo está relacionado com inúmeras doenças em humanos.

O estresse oxidativo tem atraído à atenção da comunidade científica nas últimas décadas, uma vez que estudos indicam que este está envolvido no mecanismo de muitas doenças, incluindo câncer, aterosclerose, envelhecimento, diabetes tipo 2 e doenças neurodegenerativas, como Alzheimer e doença de Parkinson (JEZEK & HLAVATÁ, 2005). Além disso, o estresse oxidativo é comumente observado em alguns erros inatos do metabolismo intermediário, participando de sua fisiopatologia (COLOME et al, 2000; DELWING et al., 2005; DELWING et al., 2006; DELWING et al., 2007; WAJNER et al, 2004). Embora a causa do estresse oxidativo aumentado nestas doenças não esteja completamente compreendida, pode ser devido ao acúmulo de metabolitos tóxicos que levam à produção excessiva de radicais livres ou à depleção celular de defesas antioxidantes (ARTUCH et al ., 2004; VAN BACKEL et al, 2000).

3.5.1 Causas dos danos celulares por estresse oxidativo

3.5.1.1 Peroxidação lipídica - (LPO)

A peroxidação lipídica (LPO) é caracterizada por uma reação em cadeia dos ácidos graxos poliinsaturados presentes nas membranas celulares, produzindo radicais livres e promovendo a alteração na integridade, permeabilidade e fluidez das mesmas (MAHATTANATAWEE et al. 2006; STAHL et al. 2001). A peroxidação lipídica inicia-se pelo ataque à bicamada lipídica de algumas espécies reativas que abstraem um átomo de hidrogênio do grupo metileno das cadeias de ácidos graxos poliinsaturados iniciando no processo de peroxidação lipídica, após ser iniciado, o processo torna-se autocatalítico e somente termina quando se esgotarem as reservas de ácidos graxos insaturados e oxigênio (ZAMBO et al. 2013). Os principais produtos finais da lipoxidação compreendem álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres e outros hidrocarbonetos derivados da decomposição de hidroperóxidos, causando danos celulares pela formação de hidroperóxidos de lipídios e lipídeos reativos que contribuem no processo de autoxidação (SULTANA et al. 2013), as membranas das células e organelas contém grandes quantidades de ácidos graxos poliinsaturados. A fluidez da membrana relaciona-se à presença de cadeias insaturadas dos fosfolipídios e do colesterol e danos desta camada lipídica tendem a diminuir a fluidez da membrana. (HALLIWELL & GUITTERIDGE, 1991).

A reação de lipoperoxidação tem atraído cientistas de diferentes áreas devido a sua relação com inúmeras doenças, tais como aterosclerose (BERLINER; HEINECKE, 1996), câncer (HAMMAD et al. 2009; WU et al. 2010), diabetes (SILVERSTEIN; FEBBRAIO, 2009), exposição crônica ao álcool (YANG et al.2010), lesão pulmonar aguda (IMAI et al. 2008; NONAS et al. 2006) bem como doenças neurodegenerativas (SIMONIAN; COYLE, 1996), que incluem Alzheimer (MONTINE et al. 2005) e Parkinson (PORTER et al. 2010; Yin et al. 2011).

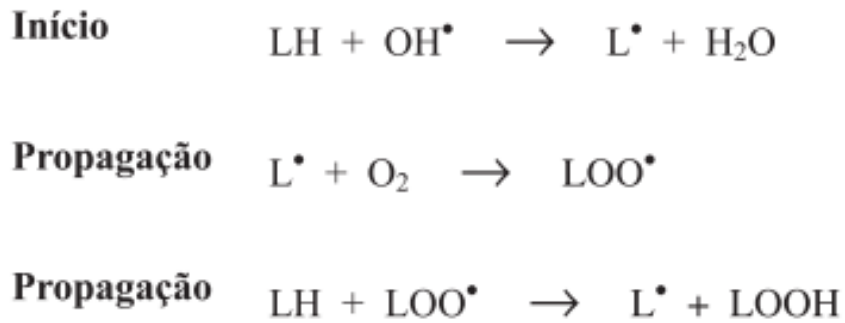


Figura 5 - Mecanismo de início e propagação da lipoperoxidação (LH: ácido graxo insaturado; L[•] : radical lipídico; LOO[•] : radical peroxila e LOOH: hidroperóxido lipídico). (Guaratini, Medeiros, Colepicolo p.; 2006).

3.5.1.2 Danos sobre às proteínas

Os radicais livres causam modificações estruturais nas proteínas levando a oxidação e conseqüentemente a perda da função e formação de grupos carbonílicos. Os resíduos carbonílicos são gerados a partir da quebra e oxidação da cadeia polipeptídica ou pela oxidação das cadeias laterais dos aminoácidos como arginina, lisina, prolina e treonina (LOPACZYNSKIA; ZEISEL, 2001). A modificação de proteínas pode ser induzida por ERO, por cátions metálicos (Fe²⁺, Cu⁺), por endobióticos (GSH), no processo da fagocitose, por irradiação, por peróxidos lipídicos, por oxidoredutases, por fármacos, etc (THÉROND et al. 2000; SHACTER, 2000).

As proteínas têm muitos sítios reativos (BARREIROS et al. 2006). Durante o estresse oxidativo, o primeiro evento é a formação de um radical centrado no carbono, por extração de H[•] do carbono α, em uma ligação peptídica, causando fragmentação das cadeias e oxidação de quase todos os tipos de aminoácidos, com produção frequente de compostos carbonilados (VASCONCELOS et al. 2007). De acordo com Vasconcelos et al. (2007) as proteínas podem conter sítios de ligação com metais que são susceptíveis a reações reversíveis de oxidação e redução, levando a produzir uma sequência de sinais que podem ser reconhecidos por proteases celulares específicas que levam a degradação das proteínas.

As EROs inibem a enzima que edita e corrige o RNA transportador, para formar a sequência correta de aminoácidos da proteína, resultando em síntese de proteínas anômalas (LING; SÖLL, 2010). Além disso, os radicais livres oxidam os aminoácidos cisteína e metionina, provocando sérias alterações na estrutura e função das proteínas (ZHANG, 2010).

A união entre proteínas danificadas e produtos da peroxidação lipídica dá origem a um pigmento fluorescente chamado de lipofuscina, o qual corresponde a um agregado que é armazenado nos lisossomos e constitui um biomarcador do envelhecimento, que se acumula no cérebro, fígado e outros órgãos ou tecidos (HÖHN et al. 2010; JUNG et al. 2010).

3.5.1.3 Danos no DNA

O estresse oxidativo induz a oxidação de proteínas, peroxidação lipídica, e danos no DNA, tanto em DNA mitocondrial quanto nuclear. Os processos de degradação podem remover os lípidos e proteínas, mas não de DNA, que necessita de ser reparado, inversamente. Quando o dano ao DNA excede a capacidade de reparo celular, o acúmulo de erros pode sobrecarregar a célula e resultar na morte celular ou a incorporação de mutações genômicas, que pode ser transmitida para as gerações celulares futuras, se ocorrer em células germinativas (BERRA, MENCK, MASCIO, 2006). Além disso, as mutações em células somáticas podem promover a instabilidade do genoma e diretamente levar a várias doenças humanas, incluindo cancro, anomalias neurológicas, imunodeficiência, e envelhecimento prematuro, entre tantas outras (IYAMA, WILSON III, 2013).

Danos ao DNA são eventos relativamente comuns durante a vida celular, podendo ocasionar mutações e morte celular ou do organismo. Tais danos induzem diversas respostas celulares, que objetivam a correção do erro, ou mesmo ativação do mecanismo de morte celular programada para eliminação de células com mutações potencialmente catastróficas (SANCAR et al. 2004).

O acúmulo de EROs representa uma importante fonte de instabilidade genômica e danos sucessivos no DNA, podendo ocasionar alterações em

genes específicos responsáveis por desempenhar funções importantes na homeostasia celular (ROESSNER et al. 2008). Entre eles estão os genes envolvidos na regulação do crescimento e diferenciação celular, reparação de dano ao DNA e nos mecanismos antioxidantes (COUSSENS; WERB, 2002; ROESSNER et al. 2008). As EROs são capazes de induzir danos diretos na molécula de DNA, como nas quatro bases do DNA, resultando em quebras simples ou duplas das cadeias com conseqüentes modificações cromossômicas e alterações oxidativas nas bases. De forma indireta, o DNA também pode ser atingido através da peroxidação lipídica, da oxidação de proteínas e de alterações na expressão gênica (COUSSENS; WERB, 2002; KRYSTON et al. 2011). O dano oxidativo devido à ação das EROs pode levar a criação de moléculas alteradas de DNA. Uma destas moléculas é chamada de 8-hidroxideoxiguanosina (8-OHdG, que se destaca pela facilidade de medição e com isso é considerada um biomarcador de dano oxidativo) (HERMES-LIMA, 2004; NEOFYTOU et al. 2012; KALYANARAMAN, 2013). O dano ao DNA produzido por oxidação é considerado o mais significativo dano oriundo do metabolismo celular, estimativas expressam que diariamente ocorrem 2×10^4 lesões oxidativas ao DNA (AMES & SHIGENOGA, 1992). Ela é potencialmente mutagênica, uma vez que tem a capacidade de se emparelhar com resíduos de adenina, aumentando a frequência de translocações espontâneas G:C→T:A (ROESSNER et al. 2008; DINCER et al. 2007).

3.6 Agentes antioxidantes X Atividade antioxidante

Estudos mostram que os antioxidantes atuam interrompendo a cadeia de reação por meio da doação de elétrons ou hidrogênio aos radicais livres, convertendo-os em produtos estáveis e/ ou reagindo com os radicais livres. Outros antioxidantes retardam o início da auto-oxidação, através da ligação a metais, sequestro de O_2 e decomposição de hidroperóxidos (LOOH) para formar espécie não radical, sendo estes considerados antioxidantes primários e secundários, respectivamente (SOUSA et al. 2007). Em sistemas aeróbicos, é essencial o equilíbrio entre agentes óxido-redutores e o sistema de defesa antioxidante, constituído por enzimas antioxidantes, que atuem como detoxificantes do agente (radicais livres) antes que ele cause a lesão celular.

Neste contexto, a enzima superóxido dismutase (SOD) desempenha um importante papel por estar envolvida na proteção celular, reduzindo a toxicidade das ERO (FERNANDES, 2005; ROSS, 1991). É uma das principais enzimas utilizadas no combate ao dano oxidativo (CHANDRAN et al. 2005; GU et al. 2006; AVILEZ et al. 2008), pois catalisa a dismutação de dois O_2^- gerando H_2O_2 e O_2 (YU, 1994).

Os antioxidantes podem ser encontrados naturalmente no organismo humano e em alimentos, sendo responsáveis pela proteção do organismo da ação deletéria dos radicais livres (HALLIWELL & GUITTERIDGE, 2000; PÔVOA, 1995; YOUNGSON, 1995), uma vez que são capazes de neutralizar as ações dos radicais livres (Figura 3) com o propósito de evitar os danos oxidativos. Os antioxidantes biológicos incluem várias enzimas, entre elas a glicose oxidase, superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase, etc (YOUNGSON, 1995). Os antioxidantes estão em permanente atividade no organismo, tendo em vista que a produção energética é o principal responsável pela formação de radicais livres, precisando assim que os antioxidantes estejam presentes em quantidade suficiente para a neutralização desses radicais (SHILS et al., 2009). Esse sistema antioxidante evita danos celulares, alterações proteicas e o desenvolvimento de patologias (AMES; SHIGENAGA; HAGEN, 1993; BIANCHI; ANTUNES, 1999; PENTEADO, 2003;).

Organismos aeróbicos contam com uma série de enzimas e moléculas antioxidantes que combatem a propagação e os danos causados pelas EROs, conferindo proteção às células. Os antioxidantes podem ser de fontes endógenas como as enzimas que atuam na mitocôndria, ou exógenas como a alimentação ou suplementação com vitaminas antioxidantes (VASCONSELOS et al., 2007).

O sistema enzimático é composto pelas enzimas de defesas antioxidantes enzimáticas incluem a atividade da Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathione Peroxidase (GSH-Px), esta última sendo a enzima antioxidante mais abundante no corpo humano, Entre as principais defesas não-enzimáticas estão as vitaminas C e E, carotenóides, flavonóides, pigmentos biliares, urato e a glutathione (GSH), todos sendo sequestradores de radicais, (SCOTTI; VELASCO, 2003; PENTEADO, 2003; YU, 1994; CHANCE; BOVERIS, 1979). O sistema enzimático é o primeiro a agir, evitando o acúmulo

de $O_2^{\bullet-}$ e de H_2O_2 (HALLIWELL, 2012). As defesas não enzimáticas são moléculas que interagem com as espécies radicais e são consumidas durante a reação (SOUSA et al. 2007).

O sistema de defesa antioxidante é uma estratégia de defesa que envolve diferentes níveis de proteção. O objetivo é impedir e/ou neutralizar a formação de ERO e reparar os danos ocasionados por elas. Assim, o termo antioxidante pode ser definido como qualquer substância que atrase, previna ou remova o dano oxidativo de uma molécula-alvo (ANGELO; JORGE, 2007). As células possuem sistemas de defesa enzimáticos e não-enzimáticos para proteger seus constituintes celulares e manter o estado redox celular (DALVI, 2013). O sistema enzimático é o primeiro a agir, evitando o acúmulo de $O_2^{\bullet-}$ e de H_2O_2 (HALLIWELL, 2012). A defesa não enzimática são moléculas que interagem com as espécies radiculares e são consumidas durante a reação (SOUSA et al. 2007).

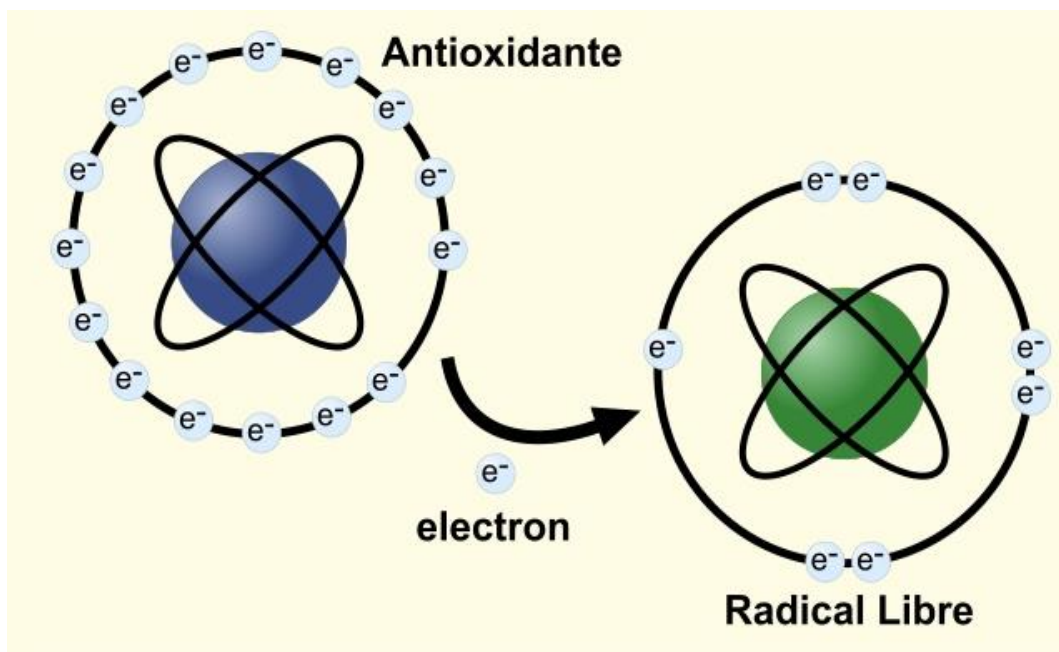


Figura 6. Antioxidantes X Radicais Livres (FANHANI, FERREIRA, 2006).

3.7 Enzimas Antioxidantes

3.7.1. Superóxido Dismutase (SOD)

A superóxido dismutase é uma das principais enzimas utilizadas no combate ao dano oxidativo das EROs (CHANDRAN et al. 2005; GU et al. 2006; AVILEZ et al. 2008). Ela catalisa a dismutação de dois radicais superóxido gerando H_2O_2 e O_2 (YU, 1994).

3.7.2 Catalase (CAT)

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

3.7.3 Glutathiona Peroxidase (GSH-Px)

A GSH tem como função proteger as células contra danos oxidativos causados por radicais oxidantes, sequestrando-os a fim de manter o balanço redox da célula e defendê-la contra agentes eletrofílicos (ANGELO; JORGE, 2007; DALVI et al. 2013; KALIORA; DEDOUSSIS, 2006; GASPARRI, 2005).

3.8 Antioxidantes exógenos

3.8.1 Ácido Ascórbico (Vitamina C)

O Ácido Ascórbico (vitamina C) é um micronutriente solúvel em água, necessário para várias funções biológicas. Atua como cofator em reações enzimáticas, como na síntese de colágeno (DARR et al. 1993). Ele é amplamente distribuído em todos os tecidos do corpo, e recicla outros antioxidantes, como a vitamina E e a GSH (HALLIWELL, 2001).

3.8.2 Alfa-tocoferol (Vitamina E)

A vitamina E com sua complexa função biológica, tem gerado enorme interesse entre as comunidades de ciências básicas e clínicas, devido a sua utilidade aparente no combate a uma série de distúrbios relacionados ao estresse oxidativo (COMBS, 2012).

3.8.3 GLUTATIONA

A glutatona possui papel central na biotransformação e eliminação de xenobióticos e na defesa das células contra o estresse oxidativo. A GSH é o mais abundante tiol celular de baixa massa molecular; a sua concentração é ~2mM e mais de 10mM em eritrócitos humanos e hepatócitos, respectivamente. Muitas das reações da GSH envolvem o grupo sulfidril (SH), altamente polarizável, tornando-o um bom nucleófilo para reações com compostos químicos eletrofílicos. Esta habilidade de doar elétrons a outros compostos também faz da glutatona um bom redutor. A combinação de sua abundância nos organismos aeróbicos e das propriedades químicas do grupo sulfidril suporta a proposta de que a GSH surgiu na evolução bioquímica como uma proteção contra espécies reativas de oxigênio e compostos eletrofílicos gerados por processos oxidativos, tanto no organismo quanto no ambiente em que este vive (ROVER JÚNIOR, HÖEHR, VELLASCO, & KUBOTA, 2001).

Glutatona, um tripeptídeo (γ -L-glutamil-L-cisteinil-glicina), existe no organismo em suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), atuando direta ou indiretamente em muitos processos biológicos importantes, incluindo a síntese de proteínas, metabolismo e proteção celular. Em particular, problemas na síntese e metabolismo da glutatona estão associados a algumas doenças,

nas quais os níveis de glutathiona e das enzimas que atuam no seu metabolismo podem ser bastante significativos no diagnóstico de alguns tipos de câncer, bem como em outras doenças relacionadas ao estresse oxidativo (ROVER JÚNIOR et al. 2001).

3.9 COLINESTERASE

A galactosemia clássica causa danos neurológicos e a acetilcolinesterase (AChE) desempenha um papel importante na manutenção da integridade e permeabilidade da membrana durante a transmissão e condução sináptica, a colinesterase sérica tem propriedades bioquímicas e características diferentes da colinesterase eritrocitária humana (ALLIES E HAWES, 1940). A acetilcolinesterase (AChE) que encontramos nos eritrócitos, possui alta afinidade por ésteres de colina, foi denominada a princípio como "colinesterase verdadeira", enquanto que a colinesterase sérica, que hidrolisa outros ésteres além dos de colina, foi designada "pseudocolinesterase" (MENDEL e COLS., 1943). Segundo a nomenclatura sistemática da Comissão de Enzimas, a colinesterase verdadeira e a pseudocolinesterase são denominadas, respectivamente, como: acetilcolina-acetilhidrolase (E. C. 3.1.1. 7) e acilcolina-acilhidrolase (E. C. 3.1.1. 8). Outras denominações da colinesterase sérica incluem: esterase da benzoilcolina e butirilcolinesterase. O termo butirilcolinesterase (BuChE) é mais usado atualmente.

A AChE desempenha um importante papel na transmissão colinérgica no sistema nervoso central (INESTROSA E PERELMAN, 1990) finalizando a ação da acetilcolina (SILVER, 1974). Tem sido demonstrado que a AChE é essencial no processo de memória e aprendizado e redução cortical na atividade da AChE tem sido associado à demência (YAMAMOTO et al., 1990). Trabalhos mostram que a atividade da AChE encontra-se reduzida no líquido (APPLEYARD et al., 1983), em eritrócitos (CHIPPERFIELD et al., 1981) e no plasma (YAMAMOTO et al., 1990) de pacientes com Doença de Alzheimer. A BuChE, também conhecida como "pseudo" colinesterase, está presente nas células hematopoiéticas, no soro, fígado, coração, endotélio vascular, nas sinapses colinérgicas periféricas e no sistema nervoso central (DUBOVY; HANINEC, 1990; MACK; ROBITZKI, 2000). Estudos têm mostrado que a

BuChE está envolvida na regulação da proliferação e diferenciação neuronal (MACK E ROBITZKI, 2000). Além disso, a BuChE glial pode hidrolisar a acetilcolina liberada produzindo colina, a qual poderá retornar para os neurônios colinérgicos (MESULAM et al., 2002).

4 METODOLOGIA

4.1 Animais

Foram utilizados ratos machos Wistar de 30 e 60 dias de idade (tamanho aproximado da amostra: 45 animais provenientes da Universidade do Vale do Itajaí – UNIVALI. Os animais foram desmamados aos 21 dias de idade. Foram mantidos em um ciclo de 12h claro/escuro à temperatura constante de 22°C com livre acesso à comida e água e mantidos separados em grupos de seis animais acomodados em local ideal para pesquisa. Os cuidados com os animais seguiram as diretrizes governamentais oficiais conforme a Federação das Sociedades Brasileiras para Biologia Experimental aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade da Região do Vale do Itajaí – UNIVALI sob protocolo número CEUA 01/14-14/03/2014.

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

4.2 Protocolo Experimental

4.2.1 Estudos *in vitro*:

Foram utilizados eritrócitos, soro e plasma de ratos machos *Wistar* não tratados. A galactose foi adicionada ao ensaio a fim de se obter as seguintes concentrações finais: 0,1, 3,0, 5,0 e 10,0 mM. O grupo controle foi realizado sem a adição da galactose.

4.2.2 Prevenção com trolox, ácido ascórbico e glutathione:

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

As doses de trolox, ácido ascórbico e glutathione seguiram os protocolos descritos por Wyse et al. (2002), Silva et al. (2004) e Avrova et al. (1999), respectivamente.

4.3 Estudos bioquímicos

4.3.1 Preparação dos eritrócitos e do plasma para determinação de parâmetros de estresse oxidativo:

Os eritrócitos e o plasma foram preparados a partir de amostras de sangue total obtidas de ratos (controles e tratados).

O sangue total foi centrifugado a 1000 x g, o plasma foi separado e congelado para posterior determinação. Os eritrócitos foram lavados 3 vezes com solução salina gelada (0,153 mol/L cloreto de sódio). Os lisados foram preparados pela adição de 1 mL de água destilada para 100 µL de eritrócitos lavados e congelados para posterior determinação da atividade das enzimas antioxidantes.

Para determinação da atividade das enzimas antioxidantes, eritrócitos foram congelados e descongelados 3 vezes e centrifugados a 13,500 x g por 10 min. O sobrenadante foi diluído para conter aproximadamente 0,5 mg/mL de proteína.

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

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

4.3.3 Catalase (CAT):

A atividade da CAT foi determinada pelo método de Aebi (1984). A decomposição do H₂O₂ foi monitorada em espectrofotômetro a 240 nm por 90 segundos. Uma unidade de enzima é definida como 1 μmol de H₂O₂ consumido por minuto e a atividade específica foi expressa em unidade por mg de proteína.

4.3.4 Glutationa peroxidase (GSH-Px):

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

4.3.5 Superóxido dismutase (SOD):

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

4.3.6 Conteúdo Total de sulfidrilas:

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

4.3.7 Ensaio da atividade da butirilcolinesterase (BuChE):

Após a decapitação, o sangue foi coletado, rapidamente centrifugado a 1000 x g por 10 min e o soro foi separado e utilizado para a determinação da atividade da butirilcolinesterase e concentração proteica. A atividade da enzima butirilcolinesterase foi determinada de acordo com o método colorimétrico de Ellman e colaboradores, (1961) com algumas modificações.

4.3.8 Dosagem de proteínas:

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

4.4. Análise estatística:

Os dados foram analisados pela análise de variância - ANOVA, seguida do teste de Duncan, quando indicado. Todas as análises foram realizadas utilizando o Statistical Package for o software de Ciências Sociais (SPSS) em um computador compatível PC. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos. Os resultados foram expressos como média \pm DP para sete experimentos independentes (animais) realizados em duplicado. *** $P < 0,001$, ** $P < 0,01$ e * $P < 0,05$, em comparação com o grupo controle.

5 REFERÊNCIAS

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

AKSENOV MY, MARKESBERY WR.**Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease**.Neurosci Lett; 302: 141–145, 2001.

ALIES, G. A E HAWES, R. C. **Cholinesterases in blood of man**. J. Biol. Chem. 133:375-390,1940.

AMES BN, SHIGENAGA MK. Oxidants are a major contributor to aging. Ann N Y Acad Sci. Nov 21;663:85–96,1992.

AMES, B. N.; SHIGENAGA, M. K.; HAGEN, T. M. **Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging**.Division of Biochemistry and Molecular Biology, University of California, v. 90, p. 7915-7922, Berkeley, 1993.

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

ANTSHEL K., EPSTEIN I., WAISBREN S. **Cognitive strengths and weaknesses in children and adolescents homozygous for the galactosemia Q188R mutation: A descriptive study**. Neuropsychology; 18:658–664, 2004.

APPLEYARD M.E., SMITH A.D., WILCOCK G.K., ESIRI M.M. **Decreased CSF acetylcholinesterase activity in Alzheimer's disease**.Lancet . 2: 452,1983

ARTUCH R., COLOME C., SIERRA C., BRANDI N., LAMBRUSCHINI N., CAMPISTOL J., UGARTE D., VILASECA M.A. **A longitudinal study of antioxidant status in phenylketonuric patients**. Clin Biochem.; 37:198–203, 2004.

AVILEZ IM, HORI TSF, ALMEIDA LC, HACKBARTH A, BASTOS NETO JC, BASTOS VLFC & MORAES G.**Effects of phenol in antioxidant metabolism**

in matrinxã, Brycon amazonicus (Teleostei; Characidae). Comparative Biochemistry and physiology Part C 148:136-142, 2008.

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

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; PAULA, S. O.; MININ, V. P. R.; BRESSAN, J. **Estresse oxidativo: avaliação de marcadores.** Nutrire: Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição, v.33, n.2, p.111-128, 2008.

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

BECKMAN, J. S. **The physiological and pathological chemistry of nitric oxide.**In: LANCASTER, J. ed. Nitric oxide: Principles and actions.San Diego: Academic Press, 1996. p. 1-83.

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

BERLINER, J. A.; HEINECKE, J. W. **Free Radical Biol. Med.** v. 20, p. 707-727, 1996.

BERRA, C. M., MENCK, C. F. M., and MASCIO, P. Di, **“Oxidative stress, genome lesions and signaling pathways in cell cycle control,”** Quimica Nova, vol. 29, no. 6, pp. 1340–1344, 2006. View at Publisher · View at Google Scholar · View at Scopus

BIANCHI, M. L.; ANTUNES, L. M. G. **Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta.**Revista de Nutrição, Campinas, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.

BOSCH, AM. **Classical galactosaemia revisited. Metabolic dissertation.** Journal Inherited Metabolism Disease. 2006; 29(4): 516-525.

BOSCHA.M., **Classical galactosaemia revisited**, J. Inherit. Metab.Dis. 29 (2006)516e525.

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

FRIDOVICH-KEIL J.L., WALTER J.H. **Galactosemia**, in: D. Valle (Ed.), **The Online Molecular and Metabolic Basis of Inherited Disease e OMMBID**, McGraw-Hill, Inc., New York, 2008. Part 7, (Chapter 72).

CARDEAL; I. C. M. A; **Uso terapêutico de chaperones em doenças conformacionais**;2013. Dissertação mestrado (Ciências Farmacêuticas) - Universidade Fernando Pessoa.

CHANCE B, SIES H, BOVERIS A. **Hydroperoxide metabolism in mammalian organs**. Physiol Rev 1979;59(3):527-605.

CHANDRAN, R.; SIVAKUMAR, A. A.; MOHANDASS, S.; ARUCHAMI, M. **Effect of cadmium and zinc on antioxidant enzyme activity in the gastropod, Achatina fulica**.Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol, v. 140, n. 3-4, p. 422-426, 2005.

CHARLWOOD J., CLAYTON P., KEIR G., MIAN N., WINCHESTER B. **Defective galactosylation of serum transferrin in galactosemia**. Glycobiology 1998; 8:351–357.

CHIPPERFIELD, B., NEWMAN, P.M., MOYES, I.C.A. **Decreased erythrocyte cholinesterase activity in dementia**. Lancet 1981; 2: 199.

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

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

COUSSENS, L. M.; WERB, Z. **Inflammation and Cancer**. Nature, v.420, p.19-26, 2002

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

DARR, D.; COMBS, S.; PINNELL, S. **Ascorbic acid and collagen synthesis: rethinking a role for lipid peroxidation.** Arch Biochem Biophys. v. 307, n. 2, p. 331-5, 1993.

DELWING D., CHIARANI F., BAVARESCO C.S., WANNMACHER C.M.D., WAJNER M., DUTRA-FILHO C.S., WYSE A.T.S. **Protective effect of antioxidants on brain oxidative damage caused by proline administration.** Neuroscience Research.2005; 52: 69–74.

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

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

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

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

DUBOVY P., HANINEC P. **Non-specific cholinesterase activity of the developing peripheral nerves and its possible function in cells in intimate contact with growing axons of chick embryo.** Ont J Dev Neurosci. 1990; 8: 589–602.

DUBROFF J.G., FICICIOGLU C., SEGAL S., WINTERING N.A., ALAVI A., NEWBERG A.B. **FDG-PET findings in patients with galactosaemia.** J Inherit Metab Dis. 2008; 31:533–539.

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

ELSAS L.J. **Galactosemia.** IN: PAGON RA, BIRD TD, DOLAN CR, STEPHENS K, ADAM MP, eds. *Gene Reviews TM* [Internet]. Seattle, WA: University of Washington, Seattle; 1993 [updated October 2010].

ELSAS LJ. **Galactosemia.** In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, Stephens K, Adam MP, eds. *Gene Reviews.* Seattle, WA: University of Washington, Seattle; 2000.

ESTERBAUER H., CHEESEMAN K.H. **Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal.** *Methods Enzymol.* 1990; 186:407–421.

FERNANDES A. G., MAFRA D. **Zinco e câncer: uma revisão.** *Rev. Saúde. Com.* v. 1, n. 2, p.144-156, 2005.

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

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

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

GIMENEZ-SANCHES, G.; CHILDS, B.; VALLE, D. **The effect of mendelian disease on human health.** In: SCRIVER, C. H. et al. (eds.). *The metabolic and molecular bases of inherited disease.* 8. ed. New York: McGraw-Hill, 2001. p. 67-174.

GITZELMANN R. **Galactose-1-phosphate in the pathophysiology of galactosemia.** Eur J Pediatrics. 1995; 154 (Suppl 2):S45–S49.

GIUGLIANI, R.; COELHO, J. C. **Diagnóstico de erros inatos do metabolismo da América Latina.** Braz J Gen, v. 20, p. 147-54,1997

GREEN, K.; BRAND, M. D.; MURPHY, M. P. **Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes.** Diabetes, v. 53, n. 1, p. 110-8, 2004. 102

GU, J.; LI, Y.; XIE, L. ZHANG, R. **Metal accumulation and enzyme activities in gills and digestive gland of pearl oyster *Pinctada fucata* exposed to copper.** Comparative Biochemistry and Physiology Part C, v. 144, n. 2, p. 184-190, 2006.

HALLIWELL, B.; GUITTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine.** 3th.ed. New York: Oxford Science Publications, 2000. 936p.

HALLIWELL B, GUTTERIDGE JMC. **Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview.** Methods Enzymol 1990; 186: 1-85

HALLIWELL B.; Reactive **Oxygen species and the central nervous system.**J Neurochem 1992; 59: 1.609-23.

HALLIWELL, B. **Free Radicals and antioxidants: updating a personal view.** Nutr Rev., v. 70, p. 257-65, 2012.

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

HELDT, H. W.; HELDT, F.**The Calvin cycle catalyzes photosynthetic CO₂ assimilation.** In: Heldt, H. W. (ed.) Plant Biochemistry (3 Ed), 2005. p. 165-193.

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

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

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

HOLTAN JB, WALTER JH, TYFIELD LA. **The metabolic and molecular bases of inherited disease – Galactosemia.** 8. Newyork: The McGraw-Hill Companies; 2001.

HOLTON J.B., WALTER J.H., TYFIELD L.A. **Galactosemia.** In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly SW, Valle D, Childs B, Kinzler KW, Vogelstein B, editors. Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. 8th edition. New York: McGraw Hill. 2000; pp 1553–1587.

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

HUGHES J., RYAN S., LAMBERT D., GEOGHEGAN O., CLARK A., ROGERS Y., HENDROFF U., MONAVARI A., TWOMEY E., TREACY E.P. **Outcomes of siblings with classical galactosemia.** J Pediatr. 2009;154:721–726.

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

INESTROSA N.C., PERELMAN A. **Association of acetylcholinesterase with the cell surface.** J Membr Biol. 1990; 118: 1–9.

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

IYAMA, T., WILSON III, D. M., “**DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells,**” **DNA Repair**, vol. 12, no. 8, pp. 620–636, 2013

JARDIM, L. B.; ASHTON-PROLLA, P. **Erros inatos do metabolismo em crianças e recém-nascidos agudamente enfermos: guia para seu diagnóstico e manejo**. J Pediatr. Rio de Janeiro. v. 72, n. 2, p. 63-70, 1996.

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

JUMBO-LUCIONI P.P., GARBER K., KIEL J., BARIC I., BERRY G.T., BOSCH A., BURLINA A., CHIESA A., PICO M.L., ESTRADA S.C., HENDERSON H., LESLIE N., LONGO N., MORRIS A.A., RAMIREZ-FARIAS C., SCHWEITZER-KRANTZ S., SILAO C.L., VELA-AMIEVA M., WAISBREN S., FRIDOVICH-KEIL J.L. **Diversity of approaches to classic galactosemia around the world: a comparison of diagnosis, intervention, and outcomes**, J Inherit Metab Dis. 2012; 35:1037–1049.

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

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

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

KOURY, J. C.; DONANGELO, C. M. **Zinco, estresse oxidativo e atividade física**. Rev Nutr., v. 16, n. 4, p. 433-41, 2003.

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

LAI, L.J. ELSAS, K.J. WIERENGA, **Galactose toxicity in animals**, *IUBMB Life* 61(2009) 1063e1074.

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

LEVY HL, BROWN AE, WILLIAMS SE, DE JUAN E., JR **Vitreous hemorrhage as an ophthalmic complication of galactosemia**. *J Pediatr.* 1996;129:922–925. doi: 10.1016/S0022-3476(96)70041-0

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

LOPACZYNSKIA, W.; ZEISEL, S. H. **Antioxidants, programmed cell death, and cancer**. *Nutr.Res.*, v. 21, n. 1, p. 295-307, 2001.

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

MACK, A, ROBITZKI A. **The key role of butyrylcholinesterase during neurogenesis and neural disorders: an antisense-5'butyrylcholinesterase-DNA study**. *ProgNeurobiol.*2000; 60: 607–628.

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

MARKLUND S. **Handbook for oxygen radical research**. Boca Raton: CRC press, 1985, p. 243-247, 447p.

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

MCCORVIE T.J., TIMSON D.J. **The structural and molecular biology of type I galactosemia: enzymology of galactose 1-phosphate uridylyltransferase**, IUBMB Life 2011; 63:694–700.

MENDEL, R; MUNDELL, D. R E RUDNEY, H. **Studies on cholinesterase. In Specific tests for cholinesterase and pseudocholinesterase.** Bioeh. J. 37:473-476, 1943.

MESULAM, M-M., GUILLOZET, A., SHAW, P., LEVEY A., DUYSSEN E.G., LOCKRIDGE O. **Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine.** (2002). Neuroscience.2002; 170: 627–639.

MILLER, D. M.; BUETTNER, G. R.; AUST, S. D. **Transition metals as catalysts of “autoxidation” reactions.** Free Radical Biology and Medicine, v.8, p.95-108, 1990.

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

NEDEL, D. R. **Antioxidantes x radicais livres: a influência das vitaminas antioxidantes no retardo do envelhecimento cutâneo.** 2005. 78f. Monografia- 107 Curso de Graduação em Farmácia, Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul, Ijuí, 2005.

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

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

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

POLLITT RJ, GREEN A, MCCABE CJ, BOOTH A, COOPER NJ, LEONARD JV, ET AL. **neonatal screening for inborn errors of metabolism: cost, yield and outcome.** Health Technol Assess 1997; 1:137-40.

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

POTTER N.L., LAZARUS J.A.C., JOHNSON J.M., STEINER R.D., SHRIBERG L.D. **Correlates of language impairment in children with galactosaemia.** Journal of Inherited Metabolic Disease. 2008; 31: 524–532.

PÔVOA FILHO, H. **Antioxidantes.** In: PÔVOA, H. **Radicais Livres: em Patologia Humana.** Rio de Janeiro: Imago, 1995, p.211-246.

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

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

ROSS D., MOLDEUS P. Antioxidant **defense systems and oxidative stress.** In VigoPelfrey C (ed): Membrane lipid oxidation. 1 th ed. Boca Raton , CRC Press, 151-70, 1991.

ROVER JÚNIOR, L., HÖEHR, N. F., VELLASCO, A. P., & KUBOTA, L. T. (2001). 112 Rover Júnior et al. Quim. Nova. **Stress The International Journal on the Biology of Stress**, 24(1), 112–119. <http://doi.org/10.1590/S0100-40422001000100019>

SANCARA., L. A. LINDSEY-BOLTZ, KEZIBAN UNSAL-KACMAZ, STUART LINN (2004). **Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints**. Annu. Rev. Biochem (73), 39-85.

SASSO, S.; **Efeito dos compostos guanidínicos acumulados na hiperargininemia sobre parâmetros de estresse oxidativo em rins, fígado e sangue de ratos: papel protetor das vitaminas E e C e do L-name**; Tese de Mestrado; Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE, Joinville; 2014.

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

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

SCOTTI, L.; VELASCO, M. V. R. **Envelhecimento cutâneo à luz da cosmetologia: estudos das alterações da pele no decorrer do tempo e da eficácia das substâncias ativas empregadas na prevenção**. São Paulo: Tecnopress, 2003.

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

SEGAL S, BERRY GT. (1995) **Disorders of galactose metabolism**. In: SCRIVER CR, BEAUDET AL, SLY WJ, VALLE D, eds. **The metabolic and molecular basis of inherited disease**. 7th. New York: McGraw Hill; pp. 967-1000.

SHACTER, E. **Quantification and significance of protein oxidation in biological samples**. Drug.Metab.Rev., v. 32, n. 3-4, p. 307-26, 2000.

SHILS, M. E. ET AL. **Nutrição moderna na saúde e na doença**. 10. ed. São Paulo: Manole, 2009.

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

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

SILVER, A. (1974). American Elsevier Publishing, New York. SILVERSTEIN, R. L.; FEBBRAIO, M. CD36, **A Scavenger Receptor Involved in Immunity, Metabolism, Angiogenesis, and Behavior**. *Sci. Signal.*, v. 2, n. 72, p. re3. 2009.

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

SLEPAK T., TANG M., ADDO F., LAI K. **Intracellular galactose-1-phosphate accumulation leads to environmental stress response in yeast model**. *MolGenet Metab.* 2005; 86:360-371.

SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA, J. G. M.; AYRES, M. C.C.; COSTA, C. L. C.; ARAÚJO, D. S. **Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais**. *Quim Nova*, v. 30, n. 2, p. 351-5, 2007.

SOUZA CF, BRUM J, REFOSCO L, BANIN M, KYOSENS. TIROSINEMIA. IN: MARTINS AM, FRANGIPANI B, MICHELETTI C, OLIVEIRA R. **Protocolo brasileiro de dietas: erros inatos do metabolismo**. São Paulo: Segmento Farma; 2006. p. 31-9.

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

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

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

THÉRON, P.; BONNEFONT-ROUSSELOT, D.; DAVIT-SPRAUL, A.; CONTI, M.; LEGRAND, A. **Biomarkers of oxidative stress: an analytical approach.** Curr.Opin.Clin.Nutr.Metab.Care, v. 3, n. 5, p. 373-384, 2000.

THODEN J.B., TIMSON D.J., **Reece R.J., Holden H.M. Molecular structure of human galactokinase: implications for type II galactosemia,** J Biol Chem. 2005; 280: 9662–9670.

TIMSON D.J. **The structural and molecular biology of type III galactosemia,** IUBMB Life 2006; 58: 83–89.

TIMSON, D.J., **The molecular basis of galactosemia — Past, present and future,** Gene (2015), 06.077

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

VALKO, M.; MORRIS, H.; CRONIN, M.T.D. **Metals, toxicity and oxidative stress.** Current Medicinal Chemistry, v.12, n.10, p.1161-1208, 2005.

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

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

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O.; FONSECA, J.; MOURA, B. F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M. S.; KUBOTA, L.T. **Espécies reativas de**

oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Quim. Nov.*, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

VÁSQUEZ AB. (2007) **Errores congénitos del metabolismo de la galactosa.** In: Sanjurjo P, Vasquez AB, eds. *Diagnóstico y tratamiento de las endermedades metabólicas hereditrias.* 2ª ed. Madrid: Ediciones Ergon; pp. 282-291. p-(2001).

WAGGONER D.D., BUIST N.R.M., DONNELL G.N. **Long-term prognosis in Galactosemia: Results of a survey of 350 cases.** *J InherMetab Dis.* 1990; 13:802–818.

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

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

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

WENDEL, A. **Glutathione peroxidase.***Method Enzymol,* v. 77, p. 325–332, 1981.

WYSE AT, ZUGNO AI, STRECK EL, MATTÉ C, CALCAGNOTTO T, WANNMACHER CM, ET al. **Inhibition of Na(+),K(+)- ATPase activity in hippocampus of rats subjected to acute administration of homocysteine is prevented by vitamins E and C treatment.** *Neurochem Res.* 2002;27(12):1685-9.

WYSE AT, BAVARESCO CS, HAGEN ME, et al. **In vitro stimulation of oxidative stress in cerebral cortex of rats by the guanidino compounds accumulating in hiperargininemia.** Brain Res 2001a; **923**: 50–57.

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

YAGER, CLAIRE et al.; **Galactitol e acumulação galactonate no coração e músculo esquelético de ratos com deficiência de uridiltransferase galactose-1-fosfato.** Genética Molecular and Metabolism, Volume 81, Issue 2, 105-111; 2003.

YAMAMOTO Y., NAKANO S., KAWASHINAS., NAKAMURA S., URAKAMI K., KATO T., KAMEYAMA M. **Plasma and serum G4 isoenzyme of acetylcholinesterase in patients with Alzheimer-type dementia and vascular dementia.** Ann Clin Biochem. 1990; 27: 321–326.

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

YOUNGSON, R. **Como combater os radicais livres: o programa de saúde dos antioxidantes.** Rio de Janeiro: Campus, 1995. 151p.

YU, P. B. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. Physiol Rev., v. 74, n. 1, p. 139-62, 1994.

ZAFFANELLO M., ZAMBONI G., SCHADEWALDT P., BORGIANI P., NOVELLI G. **Neonatal screening, clinical features and genetic testing for galactosemia.** Genet Med. 2005; 7:211–212.

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

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

6 RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1 Artigo 1

GALACTOSE CAUSES OXIDATIVE STRESS IN THE BLOOD OF RATS: PROTECTION BY ANTIOXIDANTS

Daniela Delwing de Lima^{a*}, Silmara Brietzig Hennrich^b, Leticia Dalmedico^c, Juliana Gruenwaldt Maia Aurélio^c, Ana Paula Serpa^a, Débora Delwing-Dal Magro^d

^aDepartamento de Medicina, Universidade da Região de Joinville– UNIVILLE,
Rua: Paulo Malschitzki, 10 - Zona Industrial Norte, CEP: 89201-972, Joinville,
SC, Brazil.

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

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

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

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

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

ABSTRACT

Objectives: We, herein, investigated the *in vitro* effects of galactose on thiobarbituric acid-reactive substances (TBA-RS), total sulfhydryl content, on the activities of antioxidant enzymes such as catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) and butyrylcholinesterase (BuChE) activity in the blood of 30- and 60-day-old rats. We also verified the influence of the antioxidants trolox, ascorbic acid and glutathione on the effects elicited by galactose on the parameters tested.

Methods: Galactose was added to the assay at 0.1, 3.0, 5.0 and 10.0 mM final concentrations. Control experiments were performed without the addition of galactose. Rats were sacrificed by decapitation in anesthesia absence and the blood was removed for analysis.

Results: Results showed that galactose (3.0 mM, 5.0 mM and 10.0 mM) enhanced TBA-RS in the plasma of 60-day-old, galactose (10.0 mM) reduced total sulfhydryl content in the plasma of 30-day-old, at concentration of 5.0 mM and 10.0 mM enhanced the activity of CAT in the erythrocytes of 30- and 60-day-old and at 10.0 mM reduced SOD activity in the erythrocytes of 60-day-old rats. Galactose did not alter BuChE activity. Antioxidants prevented most alteration caused by galactose on the oxidative stress parameter evaluated.

Conclusions: These findings suggest that oxidative stress may be an important contribution to the damage caused by galactose in galactosemic patients and that treatment with antioxidants may be beneficial in this pathology.

Keywords: Galactose; oxidative stress, antioxidants, blood.

INTRODUCTION

The enzyme galactose-1-phosphate uridylyltransferase (GALT) converts galactose-1-phosphate into glucose-1-phosphate, which can subsequently enter the glycolytic pathway. However, in galactosemic patients, the impairment of GALT enzyme does not allow these reactions to proceed, and therefore

galactose-1-phosphate accumulates in cells more than one order of magnitude above its normal concentration. Some hypotheses have been considered on the potential interference of galactose-1-phosphate with several enzymes of sugar metabolism[1]

Studies showed that deficiency of human GALT is detected through newborn screening in many developed countries with the objective of minimizing the acute pathology that can otherwise include jaundice, cataracts, vomiting, diarrhea, hepatomegaly, sepsis and neonatal death[2] galactose restriction in the diet can immediately mitigate or prevent these acute manifestations, but does not appear to prevent longer-term complications that include ovarian failure, mental retardation, cognitive difficulties, psychiatric symptoms, speech and motor problems, among other problems [3,4,5,6].

Free radicals are molecules that play important physiological roles in cellular signaling, immunological responses, and mitosis, protecting the organism. However, being highly unstable molecules with unpaired electrons, they have differential oxidative strengths and hence the potential to damage cellular proteins, lipids, carbohydrates and nucleic acids [7]. A balance between oxidant and antioxidant intracellular systems is necessary for cell function. An imbalance in oxidant–antioxidant activity is involved in much free radical-mediated pathology[8].

Hence, endogenous and exogenous antioxidants, as well as the enzymes of antioxidative defense are crucial for tissue protection under oxidative stress. Some studies have shown that natural substances are potential neuroprotective agents, since can scavenge free radicals and protect cells from oxidative damage[9,10,11].

Therefore, considering the absence of studies on galactose in the peripheral system, the purpose of this study was to investigate the *in vitro* effects of different concentrations of galactose on TBA-RS and totalsulfhydrylcontent in the plasma, on the activities of antioxidant enzymes CAT, GSH-Px, and SOD in the erythrocytes, as well as on the BuChE activity in the plasma of rats. Furthermore, we also tested the influence of trolox, ascorbic acid and glutathione on the effects elicited by galactose on the same parameters.

MATERIALS AND METHODS

Animals and reagents

Thirty and sixty-day-old Wistar rats (120 - 150g and 200 - 250 g, respectively), obtained from the Univali University, Itajaí, Brazil, were used in the experiments. The animals from our own breeding stock were maintained on a 12 h light/12 h dark cycle at a constant temperature ($22\pm 1^{\circ}\text{C}$), with free access to water and commercial protein chow. The "Principles of Laboratory Animal Care" (NIH publication 85–23, revised 1985) were followed in all the experiments and the experimental protocol was approved by the Ethics Committee for Animal Research of the Univali University, Itajaí, Brazil, under the protocol number CEUA 01/14-14/03/2014. All chemicals were purchased from Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA.

***In vitro* studies**

For *in vitro* experiments, erythrocytes, plasma and serum were pre-incubated for 1 h at 37°C in the presence of galactose at final concentrations of 0.1, 3.0, 5.0 and 10.0mM. Control experiments were performed without galactose addition. After incubation, aliquots were taken to measure TBA-RS, total sulfhydryl content, the activity of antioxidant enzymes and BuChE activity.

Trolox, ascorbic acid and glutathione administration

The assays were divided into eight groups: Group 1 (control-saline), group 2 (galactose), group 3 (control - 1.0mM trolox), group 4 (galactose + 1.0mM trolox), group 5 (control - 1.0mM ascorbic acid), group 6 (galactose + 1.0mM ascorbic acid), group 7 (control - 1.0mM glutathione), and group 8 (galactose + 1.0mM glutathione). The concentrations of trolox, ascorbic acid

and glutathione utilized in the present study were chosen according to previous studies[12,13,14], respectively.

Erythrocyte and Plasma Preparation

Erythrocytes and plasma were prepared from whole blood samples obtained from rats. Whole blood was collected and transferred to heparinized tubes for erythrocyte separation. Blood samples were centrifuged at $1,000 \times g$, plasma was then removed by aspiration and frozen at -80°C until use in assays. Erythrocytes were washed three times with cold saline solution (0.153 mol/L sodium chloride). Lysates were prepared by the addition of 1 mL of distilled water to 100 μL of washed erythrocytes and frozen at -80°C until determination of the antioxidant enzyme activities. For antioxidant enzyme activity determination, erythrocytes were frozen and thaw three times, and centrifuged at $13,500 \times g$ for 10 min. The supernatant was diluted in order to achieve an approximate concentration of 0.5 mg/mL of protein.

Thiobarbituric acid reactive substances (TBA-RS)

TBA-RS were determined according to the method described by Esterbauer and Cheeseman (1990) [15]. TBA-RS methodology measures malondialdehyde (MDA), a product of lipoperoxidation caused mainly by hydroxyl free radicals. For the *in vitro* measurements, tissues were mixed with 10% trichloroacetic acid and 0.67% thiobarbituric acid and heated in a boiling water bath for 25 min. TBA-RS was determined by the absorbance at 535 nm. A calibration curve was obtained using 1,1,3,3-tetramethoxypropane as the MDA precursor and each curve point was subjected to the same treatment as that of the supernatants. TBA-RS content was calculated as nanomoles of MDA formed per milligram of protein.

Total Sulphydryl Content

The total thiol group concentration was determined by the method of Ellman[16] Briefly, 50 μ l of homogenate was added to 1ml of phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4 containing 1mM EDTA. The reaction was started by the addition of 30 μ L of 10mM 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) and incubated for 30min at room temperature in a dark room. Total sulphydryl content was determined by measuring the absorbance at 412 nm. Analyses of blank (DTNB absorbance) was also performed. Results are reported as nmol 3-thio-2-nitrobenzoic acid (TNB)/mg protein.

Catalase Assay (CAT)

CAT activity was assayed using a UV-visible Shimadzu spectrophotometer. The method used is based on the disappearance of H₂O₂ at 240 nm in a reaction medium containing 20 mM H₂O₂, 0.1 % Triton X-100, 10 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0, and 0.1–0.3 mg protein/mL¹⁷. One CAT unit is defined as 1 μ mol of H₂O₂ consumed per minute and the specific activity is calculated as CAT units/mg protein.

Glutathione Peroxidase (GSH-Px)

GSH-Px activity was measured using *tert*-butyl-hydroperoxide as substrate NADPH disappearance was monitored at 340 nm using a UV-visible Shimadzu spectrophotometer. The medium contained 2 mM GSH, 0.15 U/mL GSH reductase, 0.4 mM azide, 0.5 mM *tert*butyl- hydroperoxide and 0.1 mM NADPH. One GSH-Px unit is defined as 1 μ mol of NADPH consumed per minute and the specific activity is presented as GSH-Px units/mg protein.

Superoxide Dismutase (SOD) assay

The method used to assay SOD activity is based on the capacity of pyrogallol to autoxidize, a process highly dependent on superoxide ($O_2^{\cdot-}$) which is a substrate for SOD[19]. Briefly, to 15 μ l of each sample, 215 μ l of a mixture containing 50 mM Tris buffer, pH 8.2, 1mM EDTA and 30 mM CAT were added. Then, 20 μ l of pyrogallol was added and the absorbance was immediately recorded each 30 s for 3 min at 420 nm using a UV-visible Shimadzu spectrophotometer. The inhibition of autoxidation of pyrogallol occurs in the presence of SOD, of which activity can be then indirectly assayed spectrophotometrically. A calibration curve was performed with purified SOD as reference, to calculate the activity of SOD present in the samples. One SOD unit is defined as the amount of SOD necessary to inhibit 50% of pyrogallol autoxidation and the specific activity is reported as SOD units/mg protein.

Butyrylcholinesterase (BuChE) activity assay

Butyrylcholinesterase activity was determined by the method of Ellman et al. (1961)[20] with some modifications. The hydrolysis rate was measured at an acetylthiocholine concentration of 0.8mM in 1mL assay solutions with 100mM phosphate buffer, pH 7.5 and 1.0mM 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid. Fifty microliters of rat plasma were added to the reaction mixture and pre-incubated for 3 min. The hydrolysis was monitored by formation of the thiolate dianion of 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid at 412 nm for 2-3 min (intervals of 30 s) at 25°C.

Protein determination

Protein was measured by the Lowry et al. (1951) [21] and Bradford (1976) [22] methods, using serum bovine albumin as standard.

Statistical analysis

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

RESULTS

***In vitro* effects of galactose on TBA-RS and total sulfhydryl content in the plasma of rats**

We initially verified the *in vitro* effects of different concentrations of galactose (0.1, 3.0, 5.0 and 10.0mM) on TBA-RS and total sulfhydryl content in the plasma of 30- and 60-day-old rats. Fig. 1A shows that galactose did not alter TBA-RS in the plasma of 30-day-old rats [$F(4,30)=2.187$; $P > 0.05$], but significantly enhanced TBA-RS in the plasma of 60-day-old rats at a concentration of 3.0 mM, 5.0 mM and 10.0mM [$F(4,30)=110.966$; $P < 0.001$]. In addition, Fig. 1B shows that galactose (10.0mM) significantly reduced total sulfhydryl content in the plasma of 30-day-old rats [$F(4,30)=11.100$; $P < 0.001$], when compared to controls. Conversely, galactose did not alter this parameter in the plasma of 60-day-old rats [$F(4,30)=0.427$; $P > 0.05$].

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

The *in vitro* effects of different concentrations of galactose (0.1 mM - 10.0mM) on the activities of antioxidant enzymes (CAT, SOD and GSH-Px) in the erythrocytes of rats were also verified. As can be seen in Fig.(2A), galactose at concentration of 5.0mM and 10.0mM enhanced the activity of CAT

[F(4,30)=3.195; P<0.05] and [F(4,30)=5.332; P<0.01] in the erythrocytes of 30- and 60-day-old rats, respectively, as compared to the control group. With regard to GSH-Px activity, fig.2B shows that exposure to various concentrations of galactose to the erythrocytes did not alter this enzyme activity in 30- and 60-day-old rats [F(4,30)=0.170; P>0.05] and [F(4,30)=0.811; P>0.05], respectively. Regarding the activity of SOD (Fig. 2C), galactose at 10.0mM reduced this enzyme activity [F(4,30)=3.574; P<0.05] in the erythrocytes of 60-day-old rats, in opposition, did not alter this enzyme activity in the erythrocytes of 30-day-old rats [F(4,30)=0.686; P>0.05].

***In vitro* effects of galactose on the activity of butyrylcholinesterase (BuChE) in the plasma of rats**

Subsequently, the *in vitro* effects of different concentrations of galactose on the BuChE activity were also analyzed. According to fig. 3, galactose, at any concentration, did not alter this enzyme activity in the plasma [F(4,30)=0.103; P>0.05], [F(4,30)=0.159; P>0.05] of 30- and 60-day-old rats, respectively.

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

Finally, this study evaluated whether the alterations in TBA-RS, total sulfhydryl content and on the activities of antioxidant enzymes caused by galactose (*in vitro*) in the blood of rats were mediated by the generation of free radicals. Considering this hypothesis, we examined the possible action of the antioxidants trolox, ascorbic acid and glutathione on the effects elicited by galactose on these parameters. As can be seen in Fig. 4, ascorbic acid and glutathione were able to prevent the increase in TBA-RS in the plasma of 60-day-old rats (A) [F(15,96)=115.511; P<0.001], but not trolox that did not prevent the increased caused by galactose at 3.0mM, 5.0mM and 10.0mM. About totalsulfhydrylcontent (B) [F(7,48)=53.730; P<0.001], trolox prevented the reduction caused by galactose 10.0mM in the plasma of 30-day-old rats, but ascorbic acid prevented partially this reduction. With regard to the antioxidant enzymes, (Fig. 4C) shows that ascorbic acid and glutathione prevented the increase in CAT activity caused by galactose 5.0mM and 10.0mM in the erythrocytes of 30-day-old rats [F(11,72)=9.661; P<0.001], furthermore, trolox

did not prevent this alteration. By the over hand, the antioxidants prevented the increase in the CAT activity (Fig. 4D) [$F(11,72)=18.199$; $P<0.001$] caused by galactose (5.0mM and 10.0mM) in the erythrocytes of 60-day-old rats. With regard to the activity of SOD, ascorbic acid and glutathione prevented the decrease in SOD activity in this animals fluid (E) [$F(7,48)=13.653$; $P<0.001$], but ascorbic acid not prevented this alteration in SOD activity caused by galactose.

DISCUSSION

Classic galactosemia is a rare genetic disease caused by the impairment of galactose-1-phosphate uridylyltransferase (GALT) enzyme, involved in galactose metabolism [23]. Symptoms of this disease may vary from mild to very severe, including chronic dysfunctions such as mental retardation and, in females, ovarian failure[4,5]. Considering that the pathophysiology of human GALT deficiency in galactosemia is not well understood, the main objective of the present study was to investigate the *in vitro* effects of galactose on parameters of oxidative stress and on the activity of BuChE in the blood of rats. To our knowledge, these parameters in the blood have not been investigated thus far. According to the literature, the evaluation of the extent of blood oxidative stress by standardized methods can be useful to define the role of oxidative stress in different pathologies and can be used for clinical diagnosis [24]. In this study the added galactose concentrations tested were 0.1, 3.0, 5.0 and 10.0mM. This range covers physiological and pathological concentrations including those occurring in galactosemia [25].

We initially investigated the *in vitro* effects of different concentrations of galactose (0.1 mM - 10.0mM) on an important parameter of lipoperoxidation, namely TBA-RS and on an important parameter of damage to protein, as measured by total sulfhydryl content in the plasma, as well as the activities of antioxidant enzymes (CAT,SOD and GSH-Px) in the erythrocytes of rats. Results showed that galactose did not alter TBA-RS in the plasma of 30-day-old rats, but significantly enhanced TBA-RS in the plasma of 60-day-old rats at a concentration of 3.0mM, 5.0mM and 10.0mM. In addition, results revealed that galactose (10.0mM) significantly reduced total sulfhydryl content in the plasma of 30-day-old rats, in opposition; galactose did not alter this parameter in the plasma of 60-day-old rats. TBA-RS reflect the content of malondialdehyde, the

most abundant individual aldehyde resulting from lipid breakdown due to lipid peroxidation process [26]. Moreover, peroxidative damage to membrane lipids is known to affect the membrane viscosity and barrier function and can cause diminished ATP production with subsequent dysfunction [27]. Also, alterations in the protein structure by oxidants may affect the function of receptors, enzymes, and transport proteins, resulting in a partial or complete loss of the protein functionality [12,28]. These data suggest that younger rats are more susceptible to protein damage caused by galactose *in vitro* while older rats are more likely to suffer lipid damage. These results shown that galactose causes lipid peroxidation and oxidation of sulfhydryl groups, causing damage to proteins.

The results of this research also indicate that galactose at concentration of 5.0mM and 10.0mM enhanced the activity of CAT in the erythrocytes of 30- and 60-day-old rats. With regard to GSH-Px activity, exposure to various concentrations of galactose to the erythrocytes did not alter this enzyme activity in 30- and 60-day-old rats. Regarding the activity of SOD, galactose at 10.0mM reduced this enzyme activity in the erythrocytes of 60-day-old rats, but did not alter this enzyme activity in the erythrocytes of 30-day-old rats. Considering the above, it may be assumed that galactose alters antioxidant defenses *in vitro*, since reduces SOD, increasing the levels of superoxide anion. This work also suggest that CAT activity may be increased secondarily to the production of hydrogen peroxide. Hydrogen peroxide and superoxide radical may initiate DNA damage by interaction with transition metal, in particular iron and copper, in the metal-catalysed Haber–Weiss reaction, producing hydroxyl radical, which is the most frequently considered of damaging species [30]. According to Travacio and colleagues (1996) [30] antioxidant enzymes may respond to oxidativ estress by increasing the iractivity in order to reduce damage. In addition, the enzyme ssusceptible to the attachment of free radicals could be variable. Studies carried out by Halliwell (2001) [31] have shown that oxidative stress can result from distinct situations, such as generation of reactive species at abnormally high rate, insufficient antioxidant defenses, releasing of transition metal ions, or because of a combination of these conditions [32]. In this context, we have demonstrated that galactose induces oxidative stress, because increases lipid peroxidation, causes damage to protein and alters antioxidant defenses

Previous findings reporting by Marinou and colleagues (2005) [33], showing that galactosemia *in vitro* reduced AChE activity both as pure enzyme as in brain homogenates. Since AChE is commonly known for terminating the transmission of nerve impulses by hydrolyzing acetylcholine to acetate and choline [34], reduction in this enzyme results in increases in acetylcholine levels, which may contribute to the neurological symptoms characteristic of galactosemia. Considering that galactose reduced AChE activity both as pure enzyme as in brain homogenates, subsequently, the *in vitro* effects of different concentrations of galactose on the BuChE activity were also analyzed. In opposition, in this work, galactose, at any concentration, did not alter this enzyme activity in the plasma of 30- and 60-day-old rats.

In order to prevent oxidative stress in several disorders, the effect of treatment on the lipid and protein damage and the correction of the antioxidant capacity demonstrate the importance of the supplementation with antioxidants. Finally, this study evaluated whether the alterations in TBA-RS, total sulfhydryl content and the activities of antioxidant enzymes caused by galactose (*in vitro*) in the blood of rats were mediated by the generation of free radicals. Considering this hypothesis, we examined the possible action of the antioxidants trolox, ascorbic acid and glutathione on the effects elicited by galactose on these parameters. Trolox is a well-known analog of alpha-tocopherol [35], which acts on lipid peroxy groups inside membrane bilayers, reducing them to hydroperoxides and thus inhibiting the propagation of the peroxidative chain reaction. Trolox breaks the chain reaction but is itself converted to a radical during the process. The oxidized form can be recycled back to its reduced form by ascorbate or ubiquinone (coenzyme Q) [36,37]. Glutathione (GSH) is considered an efficient protector of sulfhydryl groups and a free radical scavenger [29]. With regard to the influence of the antioxidants on the effects elicited by galactose, analyses showed that the antioxidants not alter these parameters. Results revealed that the antioxidants ascorbic acid and glutathione were able to prevent the increase in TBA-RS in the plasma of 60-day-old rats, but not trolox that did not prevent the increased caused by galactose at 3.0mM, 5.0mM and 10.0mM. About total sulfhydryl content, trolox prevented the reduction caused by galactose 10.0mM in the plasma of 30-day-old rats, but ascorbic acid prevented partially this reduction. With regard to the

antioxidant enzymes, ascorbic acid and glutathione prevented the increase in CAT activity caused by galactose 5.0mM and 10.0mM in the erythrocytes of 30-day-old rats, furthermore, trolox did not prevent this alteration. By the other hand, the antioxidants prevented the increase in the CAT activity caused by galactose (5.0mM and 10.0mM) in the erythrocytes of 60-day-old rats. With regard to the activity of SOD, ascorbic acid and glutathione prevented the decrease in SOD activity in the erythrocytes of 60-day-old rats, but ascorbic acid not prevented this alteration in SOD activity caused by galactose.

Taken together, our findings indicate that free radicals are probably involved in the pro-oxidant effects of galactose. This conclusion is reinforced by the observations showing that trolox, ascorbic acid and glutathione prevented the galactose-induced lipid and protein oxidative damage and the alteration of antioxidant defenses. The present data strongly suggest that an imbalance in the redox homeostasis occurs in this disease. In addition, our findings reinforce data that lend support to a novel adjuvant therapeutic strategy, based on antioxidant, to limit oxidative damage caused by galactose in Galactosemia.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there are no conflicts of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from Universidade da Região de Joinville and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e tecnológico – CNPq (Brasil).

REFERENCES

1. Lai, L.J. Elsas, K.J. Wierenga, Galactose toxicity in animals, *IUBMB Life* 61. 2009; 1063e1074.
2. Jumbo-Lucioni P.P., K. Garber, J. Kiel, I. Baric, G.T. Berry, A. Bosch, A. Burlina, A. Chiesa, M.L. Pico, S.C. Estrada, H. Henderson, N. Leslie, N. Longo, A.A. Morris, C. Ramirez-Farias, S. Schweitzer-Krantz, C.L. Silao, M. Vela-Amieva, S. Waisbren,

3. Elsas LJ. Galactosemia. In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, Stephens K, Adam MP, eds. GeneReviews. Seattle, WA: University of Washington, Seattle; 1993–2000.
4. Bosch, A.M., Classical galactosaemia revisited, *J. Inherit. Metab. Dis.* 29 2006; 516e525.
5. Fridovich-Keil J.L., Walter J.H. Galactosemia, in: D. Valle (Ed.), *The Online Molecular and Metabolic Basis of Inherited Disease e OMMBID*, McGraw- Hill, Inc., New York, 2008. Part 7, (Chapter 72).
6. Waisbren, S.E., N.L. Potter, C.M. Gordon, R.C. Green, P. Greenstein, C.S. Gubbels, E. Rubio-Gozalbo, D. Schomer, C. Welt, V. Anastasoie, K. D'Anna, J. Gentile, C.Y. Guo, L. Hecht, R. Jackson, B.M. Jansma, Y. Li, V. Lip, D.T. Miller, M. Murray, L. Power, N. Quinn, F. Rohr, Y. Shen, A. Skinder-Meredith, I. Timmers, R. Tunick, A. Wessel, B.L. Wu, H. Levy, L. Elsas, G.T. Berry, The adult galactosemic phenotype, *J. Inherit. Metab. Dis.* 35. 2012; 279–286.
7. Halliwell B Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem.* 2006;97:1634–1658
8. Jiang B, Liu JH, Bao YM, An LJ.. Catalpol inhibits apoptosis in hydrogen peroxide-induced PC12 cells by preventing cytochrome c release and inactivating of caspase cascade. *Toxicol.* 2004; 43(1): 53–59.
9. Zhang HX, Yu NC, Huang GF, et al.. Neuroprotective effects of purslane herb aqueous extracts against d-galactose induced neurotoxicity. *Chem Biol Interact.* 2007; 170(3): 145–152.
10. Ali SS, Kasoju N, Luthra A, et al.. Indian medicinal herbs as sources of antioxidants. *Food Res Int.* 2008; 41(1): 1–15
11. Liu T, Jin H, Sun QR, Xu JH, Hu HT.. Neuroprotective effects of emodin in rat cortical neurons against β -amyloid-induced neurotoxicity. *Brain Res.* 2010; 1347(6): 149–160.
12. Wyse AT, Zugno AI, Streck EL, Matté C, Calcagnotto T, Wannmacher CM, et al. Inhibition of Na(+),K(+)-ATPase activity in hippocampus of rats subjected to acute administration of homocysteine is prevented by vitamins E and C treatment. *Neurochem Res.* 2002;27(12):1685-9.
13. Silva C.G., Bueno A.R., Schuck P.F.,Leipnitz G., Ribeiro C.A., Rosa R.B., Dutra Filho C.S., Wyse A.T., Wannmacher C.M., Wajner M. Inhibition of

- creatine kinase activity from rat cerebral cortex by D-2-hydroxyglutaric acid *in vitro*. *Neurochem Int* 2004; 44:45-52.
14. Avrova N.F., Shestak K.I., Zakharova I.O., Sokolova T.V., Leont'ev V.G. The difference in the effect of glutamate and NO synthase inhibitor on free calcium concentration and Na⁺, K⁺-ATPase activity in synaptosomes from various brain regions. *Neurochem. Res.* 1999; 24: 1101–1106.
 15. Esterbauer H., Cheeseman K.H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol.* 1990; 186:407–421.
 16. Ellman G.L., Courtney K.D., Andres V., Featherstone R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol.* 1961; 7: 88–95.
 17. Aebi H. Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol.* 1984;105:121-6.
 18. Wendel A. Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* 1981;77:325-33.
 19. Marklund S. Handbook for oxygen radical research. Boca Raton: CRC press, 1985, p. 243-247, 447p.
 20. Ellman G.L., Courtney K.D., Andres V., Featherstone R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*, 1959.
 21. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193(1):265-75.
 22. Bradford, M.M.; A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72: 248–254.
 23. Leloir, L.F., The enzymatic transformation of uridine diphosphate glucose into a galactose derivative, *Arch. Biochem. Biophys.* 33. 1951; 186 e190.
 24. Repetto M.G., Reides C.G., Evelson P., Kohan S., De Lustig E.S., Llesuy S.F. Peripheral markers of oxidative stress in probable Alzheimer patients. *Eur. J. Clin. Invest.* 1999; 29 643–649.
 25. Gitzelmann R. Galactose-1-phosphate in the pathophysiology of galactosemia. *Eur J Pediatrics.* 1995; 154 (Suppl 2):S45–S49.

26. Halliwell, B. Free Radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutr Rev.* 2012; v. 70, p. 257-65,.
27. Mattson, MP; Metal-catalyzed disruption of membrane protein and lipid signaling in the pathogenesis of neurodegenerative disorders. *Ann N Y Acad Sci.* 2004;1012:37–50
28. Halliwell B, Whiteman M.; Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol.* 2004; 142:231–255
29. Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C.,. *Free Radicals in Biology and Medicine*, fourth ed. Oxford University, Oxford, 2007.
30. Travacio M., Llesuy S. Antioxidant enzymes and their modification under oxidative stress conditions. *Free Radic Res Latin Am* 1996; 48: 9–13.
31. Halliwell B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging.* 2001; 18 685–716.
32. Halliwell B., “Antioxidants in human health and disease,” *Annual Review of Nutrition*, 1996; vol. 16, pp. 33–50,.
33. Marinou, K., Tsakiris, S., Tsopanakis, C., Schulpis, K. H., & Behrakis, P. Suckling rat brain regional distribution of acetylcholinesterase activity in galactosaemia in vitro. *Metabolic Brain Disease*, 2005. 20(3), 227–236.
34. Grisar D., M. Sternfeld, A. Eldor, D. Glick, H. Soreq, Structural roles of acetylcholinesterase variants in biology and pathology, *Eur. J. Biochem.* 264. 1999; 672–686
35. Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. Lipid peroxidation: a radical chain reaction. In: Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (Eds.), *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford, Clarendon, UK, pp. 1996; 188–266.
36. Sies, H., Stahl, W.,. Vitamins E and C, -carotene, and other carotenoids as antioxidants. *Am. J. Clin. Nutr.* 62 (6), 1995; 1315S–1321S.
37. Wang, X., Quinn, P.J.; Vitamin E. and its function in membranes. *Prog. Lipid Res.* 1999; 38, 309–336.

LegendstoFigures

Fig. 1. *In vitro* effect of increasing concentrations of galactose (0.1 mM - 10.0 mM) on thiobarbituric acid reactive substances (TBA-RS) (A) and total sulfhydryl content (B) in plasma of rats. Results are expressed as mean \pm SD for 7 independent experiments (animals 30 and 60 days) performed in duplicate. *** $P < 0.001$, compared to control group (Duncan's multiple range tests).

Fig. 2. *In vitro* effect of increasing concentrations of galactose (0.1 mM - 10.0 mM) on the activities of CAT (A), GSH-Px (B) and SOD (C) in the erythrocytes of rats. Results are expressed as mean \pm SD for 7 independent experiments (animals) performed in duplicate. ** $P < 0.01$ and * $P < 0.05$, compared to control group (Duncan's multiple range tests).

Fig. 3. *In vitro* effect of increasing concentrations of galactose (0.1 mM - 10.0 mM) on butyrylcholinesterase (BuChE) activity in plasma of rats. Results are expressed as mean \pm SD for 7 independent experiments (animals) performed in duplicate.

Fig. 4. *In vitro* effects of trolox, ascorbic acid and glutathione on TBA-RS in the plasma of 60-day-old rats (A), on total sulfhydryl content in the plasma of 30-day-old rats (B), on CAT activity in the erythrocytes of 30-day-old rats (C) and 60-day-old rats (D) and on SOD activity in the erythrocytes of 60-day-old rats (E). Results are expressed as mean \pm SD for 7 independent experiments (animals) performed in duplicate. *** $P < 0.001$, compared to control group (Duncan's multiple range tests). Tro: trolox; Vit C: ascorbic acid; GSH: glutathione; ###: prevention partial.

Figura 1

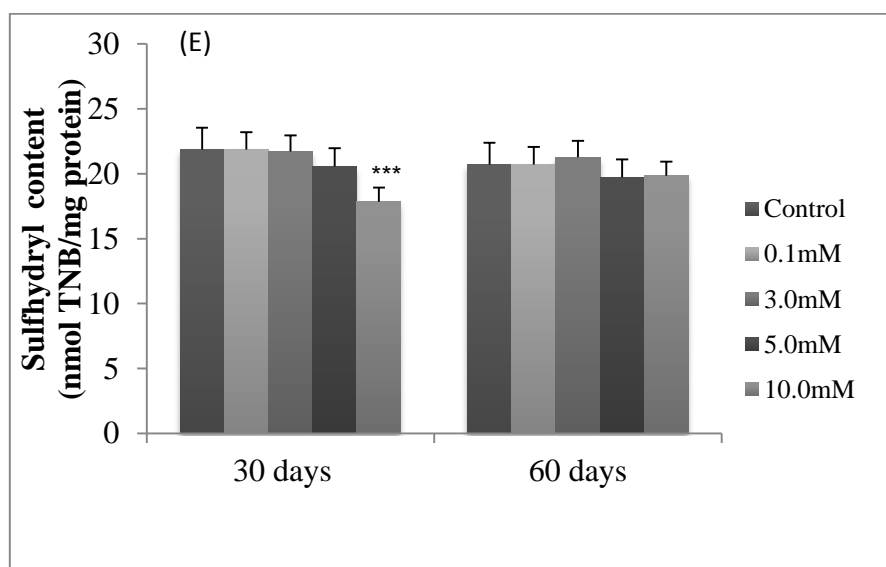
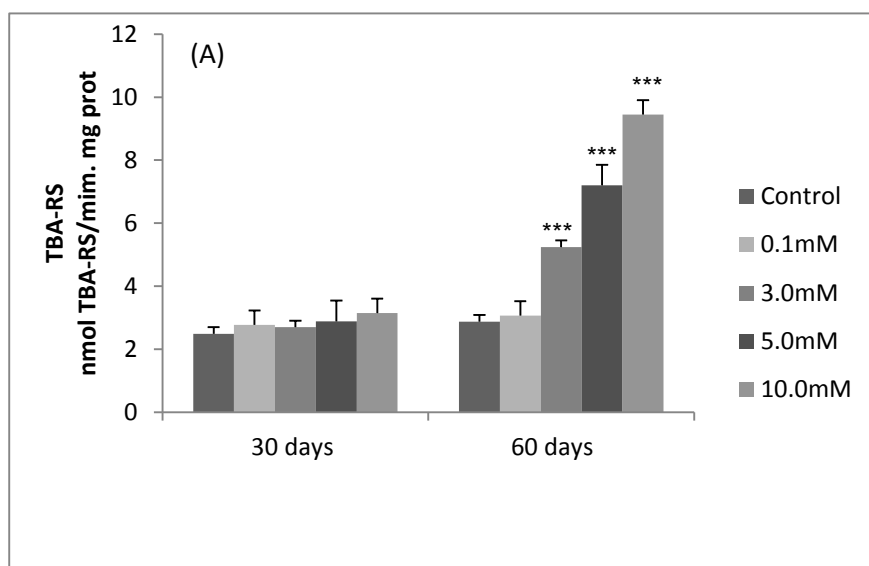


Figura 2

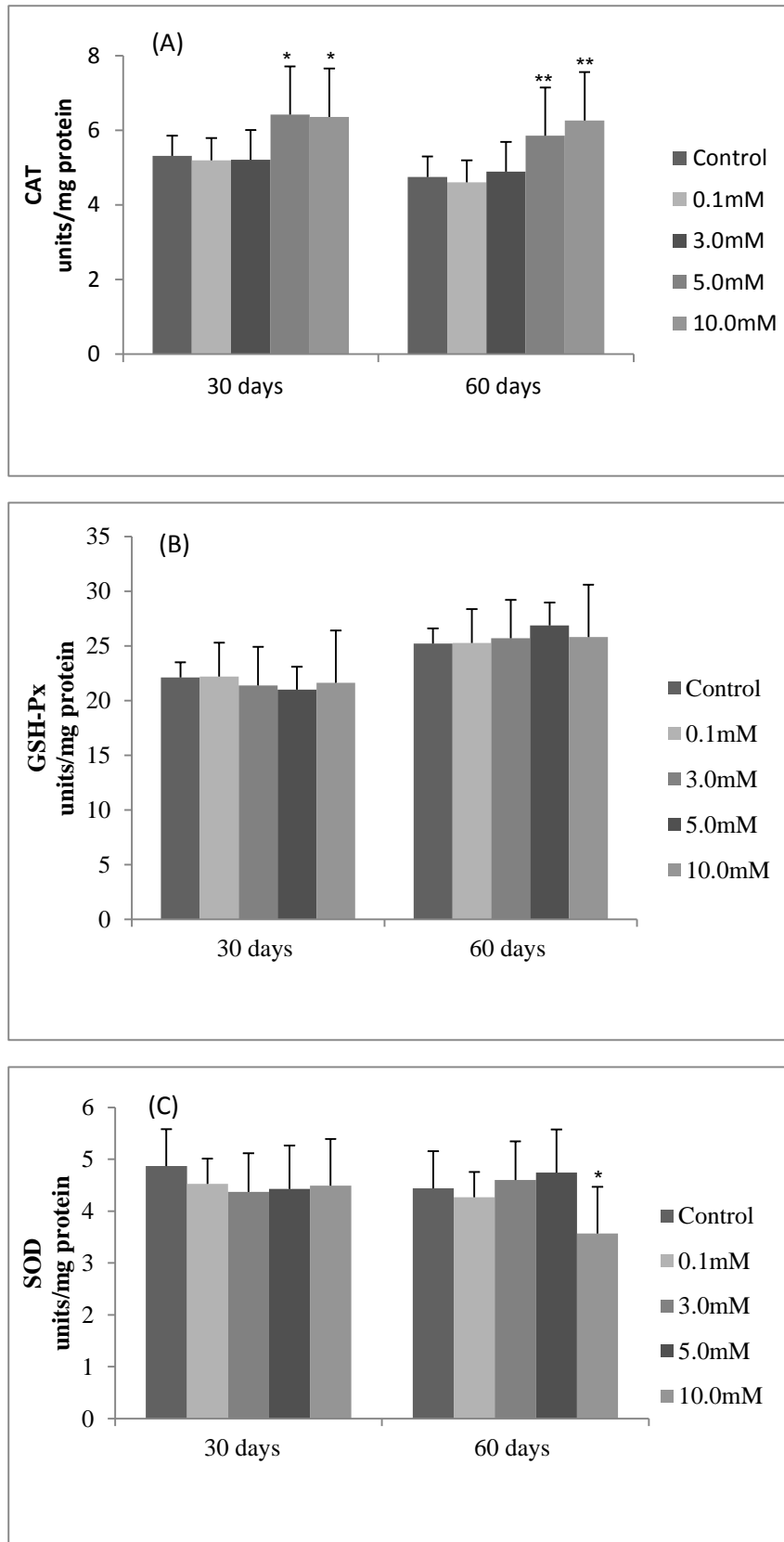


Figura 3

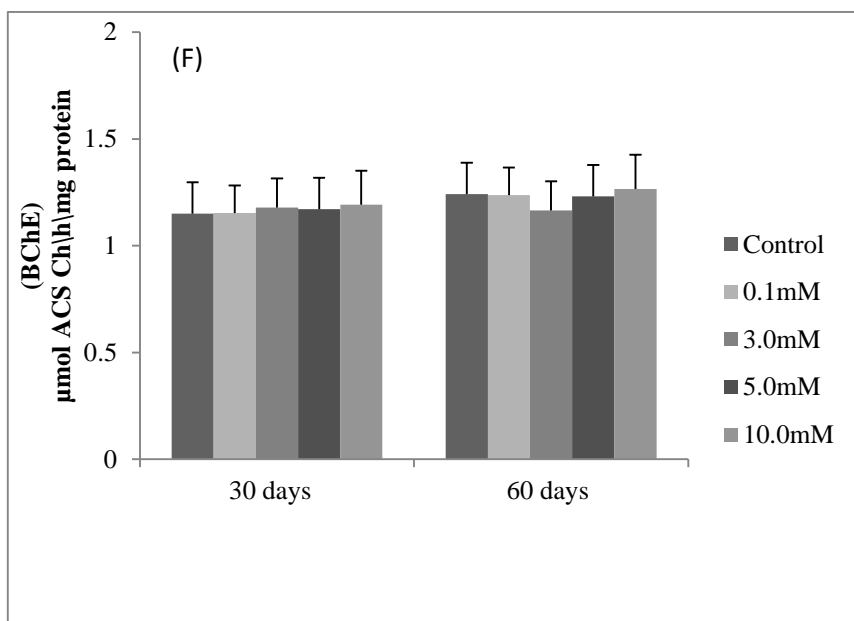
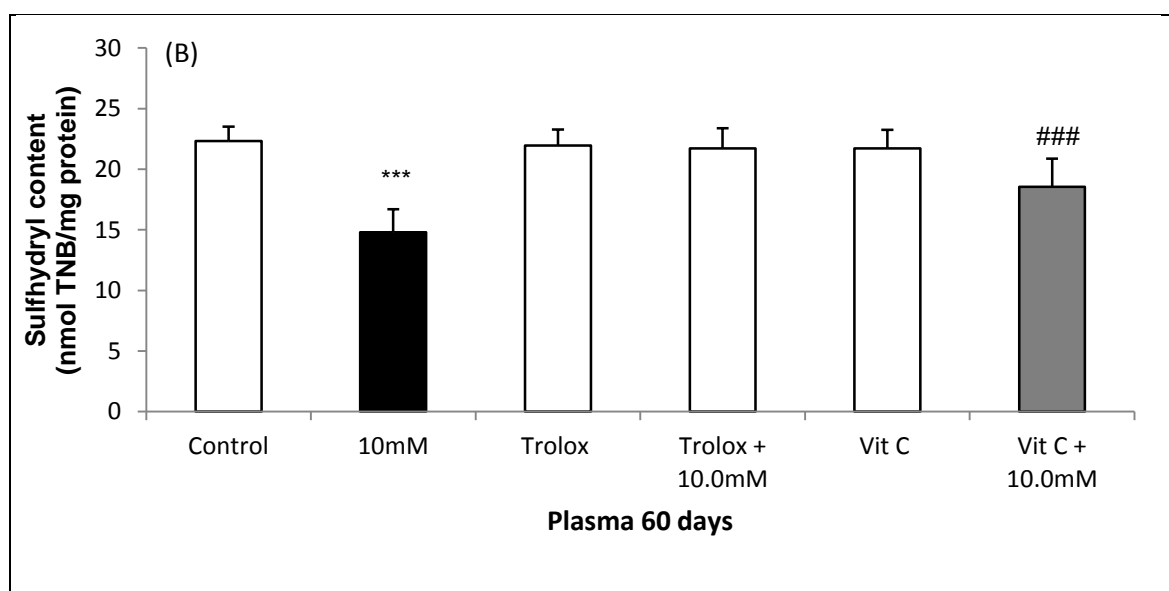
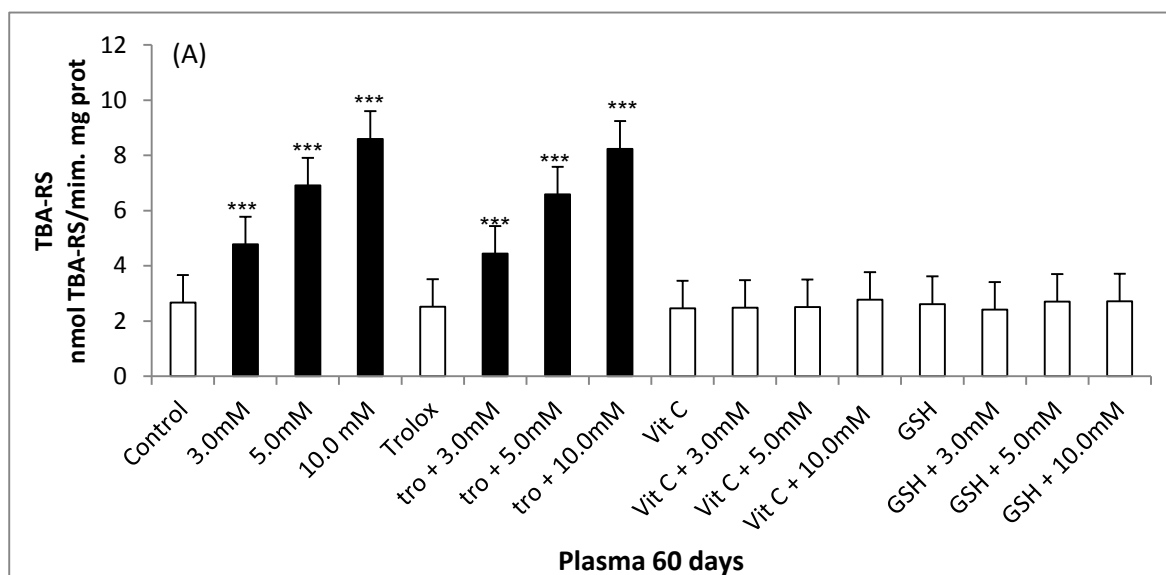
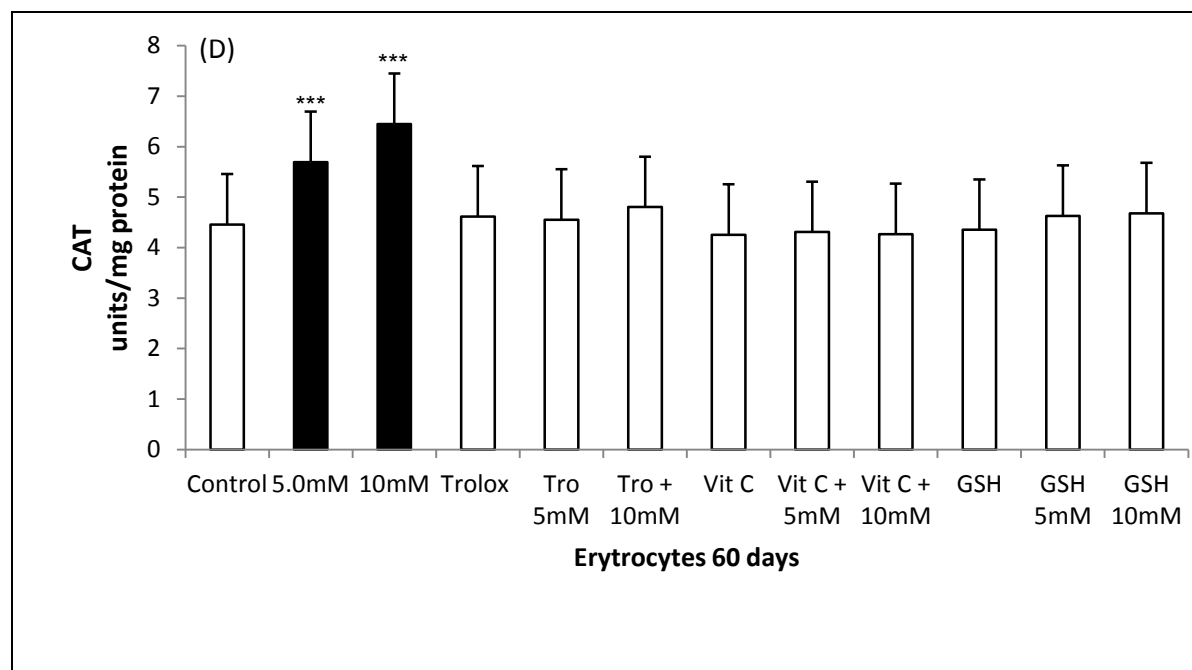
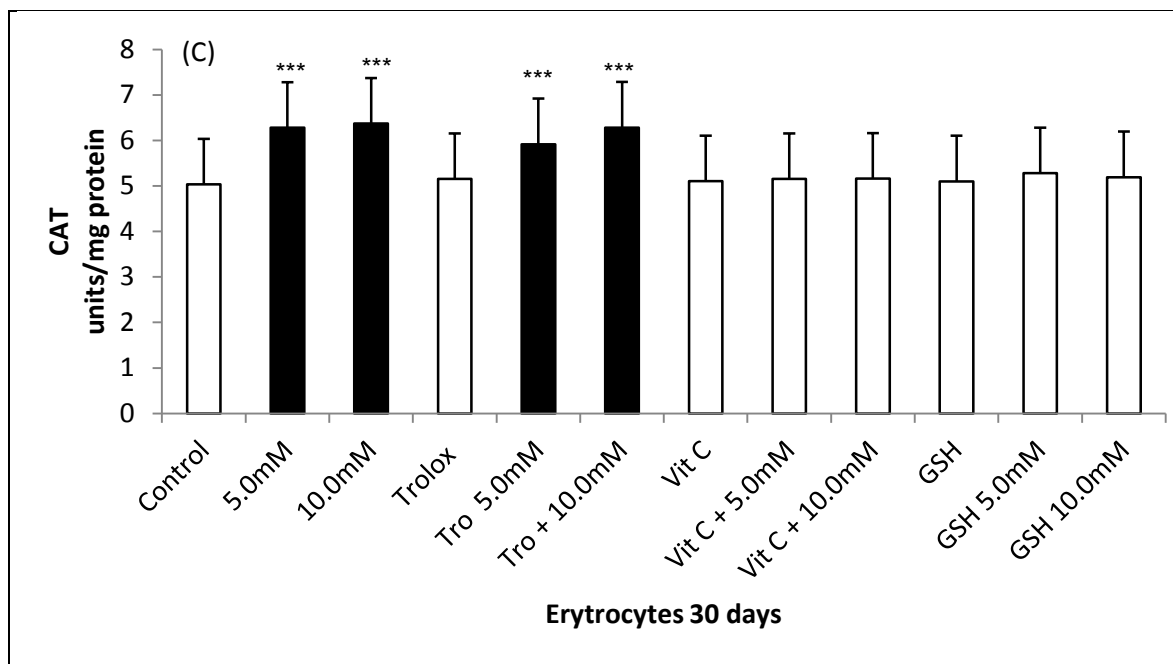
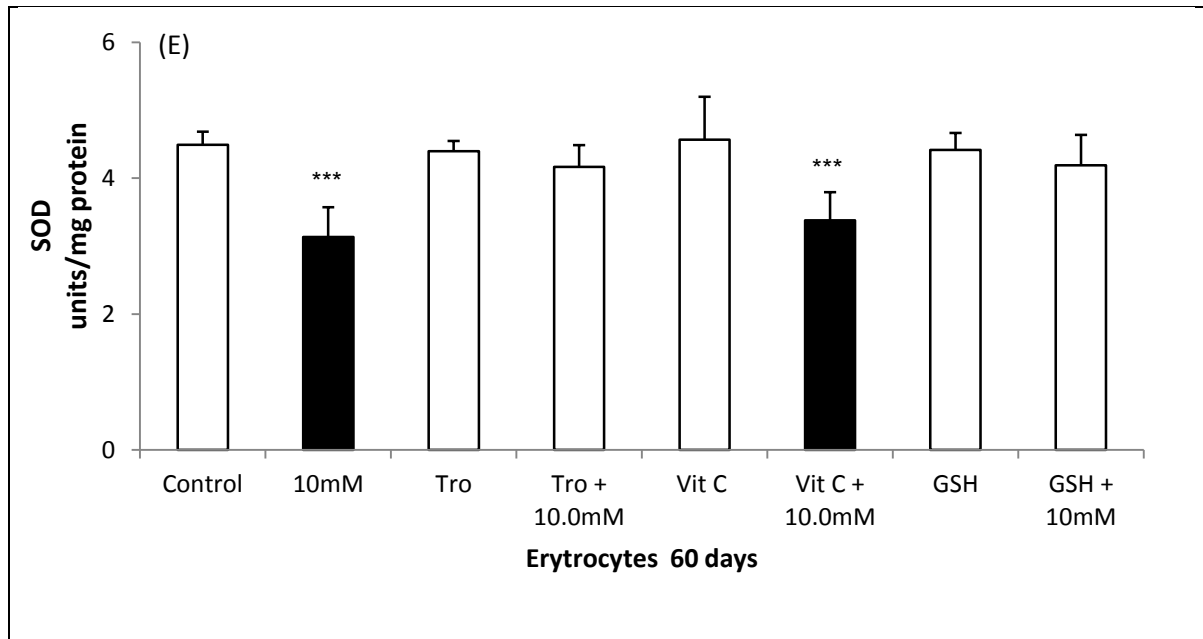


Figura 4







7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na galactosemia, os indivíduos afetados apresentam uma falha e/ou deficiência no metabolismo da galactose, não podendo efetivamente converter galactose em glicose, apresentando acúmulo deste carboidrato e seus metabólitos, como galactitol, galactonato e Gal-1-P (HOLTON et al., 2001; BOSCH, 2006). O acúmulo de Gal-1-P é decorrente da deficiência de GALT e GALE, enquanto o acúmulo de galactitol e galactonato é decorrente da deficiência da GALK (LAI et al., 2009). Esses metabólitos acumulam-se em vários tecidos, e em líquidos biológicos (HOLTON et al., 2001; BOSCH, 2006; SILVA, 2008).

Indivíduos portadores de galactosemia clássica, normalmente no seu nascimento se apresentam assintomáticos, na qual as manifestações da doença aparecem com o passar do tempo com sintomas crescentes após a exposição a uma dieta à base de leite. Na ausência de intervenção, estes sintomas, os quais incluem vômitos, diarreia, catarata, hepatomegalia e sepse por *E.coli*, podem levar à morte neonatal. Os sintomas desta doença podem variar de leve a muito grave, incluindo disfunções crônicas, tais como retardo mental e, no sexo feminino, insuficiência ovariana (BOSCH, 2006; FRIDOVICH-KEIL, 2008).

Considerando-se que a patofisiologia da deficiência humana de GALT na galactosemia não é bem compreendida, mas já se sabe que a doença causa dificuldades de cognição e comprometimento da memória, se faz necessário a correlação da evolução desta patologia com a atividade das colinesterases, entre elas a butirilcolinesterase (BuChE) que assim como a acetilcolinesterase pode estar envolvida na patofisiologia da doença, pois a BuChE está envolvida na regulação da proliferação e diferenciação neuronal (MARINOU et al., 2005; MACK E ROBITZKI, 2002). Estudos demonstraram que o estresse oxidativo está envolvido na fisiopatologia de vários EIM; nesse estudo foi investigado os efeitos *in vitro* da galactose e a influência dos antioxidantes trolox (α -tocoferol), ácido ascórbico e glutathione sobre alguns parâmetros de estresse oxidativo em eritrócitos e plasma de ratos de 30 e 60 dias de idade.

Os resultados obtidos foram os seguintes:

A galactose na concentração de 3,0mM

- Aumentou TBA-RS promovendo o aumento da peroxidação lipídica em plasma de ratos de 60 dias.

A galactose na concentração de 5,0mM

- Aumentou TBA-RS em plasma de ratos de 60 dias.
- Aumentou a atividade da CAT em eritrócitos de ratos de 30 dias
- Aumentou a atividade da CAT em eritrócitos de ratos de 60 dias.

- **A galactose na concentração de 10,0mM**

- Aumentou TBA-RS em plasma de ratos de 60 dias.
- Aumentou a oxidação de sulfidrilas em plasma de ratos de 30 dias
- Aumentou a atividade da CAT em eritrócitos de ratos de 30 dias
- Aumentou a atividade da CAT em eritrócitos de ratos de 60 dias
- Diminui a atividade da SOD em eritrócitos de ratos de 60 dias

- **Prevenção com trolox, ácido ascórbico e glutathione sobre os efeitos causados pela galactose nas concentrações de 3,0mM, 5,0mM e 10mM**

- O ácido ascórbico e glutathione foram capazes de impedir o aumento do TBA-RS em plasma de ratos de 60 dias de idade, porém o trolox não conseguiu impedir o aumento causado pela galactose 3,0mM, 5,0mM e 10,0mM.

- Sobre o conteúdo total de sulfidrilas, o trolox impediu a redução causada pela galactose na concentração de 10,0mM no plasma de ratos de 30 dias de idade, porém o ácido ascórbico conseguiu prevenir parcialmente esta redução.

- O ácido ascórbico e a glutathione preveniram o aumento na atividade da CAT causada por galactose na concentração de 5,0mM e 10,0mM em eritrócitos de ratos de 30 dias de idade, porém o trolox não previniu.

- Por outro lado os antioxidantes conseguiram prevenir o aumento na atividade da CAT causada por galactose nas concentrações de 5,0mM e 10,0mM em eritrócitos de ratos de 60 dias de idade.

- O ácido ascórbico e a glutathione preveniram a diminuição da atividade da SOD, mas o ácido ascórbico não preveniu a alteração causada pela galactose.

Os estudos demonstraram resultados que indicam que os radicais livres estão provavelmente envolvidos nos efeitos pró-oxidantes da galactose. Esta conclusão é reforçada pelas observações mostrando que o trolox, o ácido ascórbico e a glutathione impediram o dano lipídico e proteico oxidativo induzido pela galactose e a alteração das defesas antioxidantes. Os dados obtidos sugerem fortemente que um desequilíbrio na homeostase redox ocorre nesta doença. Além disso, os resultados reforçam dados que dão suporte a uma nova estratégia terapêutica adjuvante, com base na administração de antioxidantes, para limitar o dano oxidativo causado pela Galactosemia.

As análises para glutathione peroxidase (GSH-Px) foram realizadas, porém não foram relatadas.

Em relação à butirilcolinesterase não foi alterada sua atividade pelas diferentes concentrações de galactose nos ratos de 30 e 60 dias de idade.

AUTORIZAÇÃO

Nome do autor: ***Silmara Brietzig Hennrich***

RG: 3.385.353 - SC

Título da Dissertação:

“Papel protetor de antioxidantes clássicos sobre o dano oxidativo sanguíneo em ratos causado pela galactosemia clássica”.

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

Joinville, 10/05/2016.

Silmara Brietzig Hennrich