

UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
UNIDADE ACADÊMICA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE FARMÁCIA

JUSSARA PANATTO DAROS

ALTAS CONCENTRAÇÕES DE GALACTOSE AUMENTAM A ATIVIDADE DA
ENZIMA ACETILCOLINESTERASE EM CÓRTEX CEREBRAL DE RATOS
JOVENS IN VITRO

CRICIÚMA, JUNHO DE 2011

JUSSARA PANATTO DAROS

**ALTAS CONCENTRAÇÕES DE GALACTOSE AUMENTAM A ATIVIDADE DA
ENZIMA ACETILCOLINESTERASE EM CÓRTEX CEREBRAL DE RATOS
JOVENS *IN VITRO***

Trabalho de conclusão de curso apresentado para obtenção do grau de Farmacêutico no curso de Farmácia da Universidade do Extremo Sul Catarinense.

Orientadora: Prof. Dr^a Patrícia F. Schuck

CRICIÚMA, JUNHO DE 2011

JUSSARA PANATTO DAROS

**ALTAS CONCENTRAÇÕES DE GALACTOSE AUMENTAM A ATIVIDADE DA
ENZIMA ACETILCOLINESTERASE EM CÓRTEX CEREBRAL DE RATOS
JOVENS *IN VITRO***

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado
pela Banca Examinadora para obtenção do
Grau de Graduada, no curso de Farmácia, da
Universidade do Extremo Sul Catarinense,
UNESC.

Criciúma, 17 de junho de 2011.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Patricia Fernanda Schuck – Doutora – UNESC – Orientadora

Prof. Gustavo Costa Ferreira – Doutor – UNESC

Prof. Emílio Luiz Streck – Doutor – UNESC

Ao saudoso primo Daniel Daros e Maria Rosso (in memoriam).

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por toda a conquista até este momento, que sempre me deu força nos momentos mais difíceis, e que me deu muitas alegrias e realizações nesse caminho.

Às pessoas que me ajudaram e que sempre me deram força, coragem e acima de tudo amor, minha família, meus pais Defende e Maria e meus irmãos Juanita e Álvaro. Ao meu namorado Ricardo, ao cunhado Paulo Ricardo aos meus tios Pedro e Claudina, que participaram intensamente nessa minha trajetória, e que muito me ajudaram, oferecendo-me carinho, amizade, companheirismo e acima de tudo amor.

À Daiane Rezin, pessoa especial, que abdicou de alguns momentos de sua vida para colaborar na elaboração deste trabalho.

À todas as minhas colegas, a todos os professores do Curso de Farmácia que contribuíram, e muito, para conquistar meu caminho e me tornar um profissional.

À minha orientadora Patrícia Fernanda Schuck que muito me ajudou no desenvolvimento desse trabalho, transmitindo-me conhecimento e me direcionando na conclusão desse desafio.

Ao longo dessa trajetória muito aprendi sob vários aspectos pessoais e profissionais e cada um de vocês aqui mencionados fizeram parte desta minha conquista.

Meu muito obrigada!!!

Artigo Científico

***ALTAS CONCENTRAÇÕES DE GALACTOSE AUMENTAM A ATIVIDADE DA ENZIMA
ACETILCOLINESTERASE EM CÓRTEX CEREBRAL DE RATOS JOVENS IN VITRO***

*Jussara Panatto Daros; Fábio Almeida Moraes; Liliane Borges Rodrigues; Jéssica De Luca
Machado; Camila Brulezi Furlanetto; Daiane Bittencourt Fraga; Gustavo da Costa Ferreira;
Emilio Luiz Streck; Alexandra Ioppi Zugno; Patrícia Fernanda Schuck*

Artigo científico submetido para publicação no periódico *Metabolic Brain Disease*.

**Altas concentrações de galactose aumentam a atividade da enzima acetilcolinesterase em
córtex cerebral de ratos jovens *in vitro***

Jussara Panatto Daros¹; Fábio Almeida Morais¹; Daiane Bittencourt Fraga²;
Liliane Borges Rodrigues¹; Jéssica De Luca Machado¹; Camila Brulezi Furlanetto¹;
Gustavo da Costa Ferreira¹; Emilio Luiz Streck³; Alexandra Ioppi Zugno²;
Patrícia Fernanda Schuck^{1,*}

¹Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, Brasil; ²Laboratório de Neurociências, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, Brasil; ³Laboratório de Bioenergética, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, Brasil.

*Autor correspondente: PF Schuck, Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo, Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, 88806-000, Criciúma, SC, Brazil. Tel: +55 48 34312539. Fax: +55 48 34312671, E-mail: schuck@unesc.net

Resumo

A galactosemia é resultado de uma deficiência genética na capacidade de metabolizar galactose, que leva a concentrações anormalmente altas desse carboidrato e de seus derivados metabólicos nos tecidos e fluidos do corpo. A doença se manifesta, inicialmente, com falha no crescimento, vômitos, diarreia e disfunções hepáticas. Contudo, a longo prazo, prevalecem dentre as complicações as disfunções cognitivas a letargia, hipotonia, retardo mental, afasia e, em crianças, deficiência da percepção visual. Essas disfunções cognitivas afetam 30 a 50% dos pacientes tratados, o que reforça a necessidade de investigar os mecanismos fisiopatológicos do dano cerebral apresentado pelos pacientes afetados por galactosemia. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade da enzima acetilcolinesterase em córtex cerebral de ratos submetidos a um modelo experimental *in vitro* de galactosemia. Os homogeneizados de córtex cerebral foram incubados na presença ou ausência (grupo controle) de galactose (0,01, 0,05, 1, 5 e 10 mM) por 1 h. Em seguida, foi avaliada a atividade da enzima acetilcolinesterase em córtex cerebral de ratos. Observamos que altas concentrações de galactose ocasionaram um aumento significativo na atividade da enzima acetilcolinesterase, quando comparados ao grupo controle. Os resultados apresentados no presente trabalho sugerem que altas concentrações de galactose possam ocasionar alterações em sinapses colinérgicas. Caso estes dados possam ser extrapolados para a condição humana, poderiam explicar, ao menos em parte, o dano cerebral encontrado em pacientes afetados por galactosemia.

Palavras-Chave: galactosemia, galactose, acetilcolinesterase

INTRODUÇÃO

A galactosemia é um erro inato do metabolismo caracterizado bioquimicamente pelo acúmulo de galactose, galactose-1-fosfato e galactitol nos líquidos e fluidos biológicos dos pacientes. É um erro inato do metabolismo dos carboidratos, de herança autossômica recessiva, causado pela deficiência de uma das três enzimas envolvidas no metabolismo da galactose: galactosequinase (GALK; EC 2.7.1.6), galactose-1-fosfato uridiltransferase (GALT; EC 2.7.7.12) e UDP-galactose-4-epimerase (GALE; EC 5.1.3.2) (Holden, Rayment e Thoden, 2003). Acúmulo de galactose é visto nos três tipos de galactosemia, mas acúmulo de galactose-1-fosfato ocorre somente nas deficiências de GALT (galactosemia clássica) e de GALE. Na deficiência de GALK também há aumento de galactitol e galactonato (Lai et al, 2009). As apresentações clínicas da galactosemia variam conforme a enzima deficiente na via de degradação da galactose, e incluem catarata, retardo mental, ataxia, dispraxia, vômitos, diarreia, hipotonia, letargia, icterícia, hepatomegalia, insuficiência hepática e doença tubular renal, sendo as alterações neurológicas as mais proeminentes (Fridovich-Keil e Walter, 2001).

Dados sobre a frequência de galactosemia variam conforme o local do estudo. Em Nova Iorque e Columbia Britânica, a frequência é de aproximadamente 1:35.000 nascidos vivos (Camelo Jr. et al., 2009). Na Holanda, estima-se que a prevalência seja de 1:33.000 (Bosch et al., 2004), enquanto que na África, estima-se que a frequência seja de 1:14.400 recém nascidos (Camelo Jr. et al, 2009). No Brasil, há uma frequência estimada de 1:20.000 nascidos vivos (Camelo Jr. et al, 2009).

A importância do metabolismo normal da galactose foi reconhecida há mais de trinta anos, quando pesquisadores reconheceram as quatro enzimas presentes na Via de Leloir (Holden, Rayment e Thoden, 2003). Mesmo após décadas de estudo das bases fisiopatológicas da galactosemia, muitas questões permanecem desconhecidas quanto à toxicidade da galactose e seus metabólitos (Mumma et al, 2008; Lai et al, 2009). Poucos estudos foram realizados com o intuito de demonstrar efeitos tóxicos da galactose e da galactose-1-fosfato. Woolley and Gommi (1964) demonstraram que um excesso de galactose inibe a síntese de receptores de serotonina, o que poderia estar relacionado ao grave retardo mental apresentado por pacientes afetados pela galactosemia. Altas concentrações de galactose também foram capazes de diminuir o número de células de Purkinje viáveis, entretanto os mecanismos pelos quais isso ocorre não foram ainda descritos (Friedman et al., 1989).

Atualmente, cinco mecanismos têm sido propostos para explicar a fisiopatologia da galactosemia em nível celular: i) o acúmulo de metabólitos após o bloqueio das reações catalisadas pelas enzimas GALK, GALT, ou GALE; ii) acúmulo de produtos tóxicos alternativos do catabolismo da galactose; iii) deficiência de UDP-galactose, levando à diminuição da biossíntese de glicoproteínas e glicolípideos; iv) toxicidade pré-natal, causada pela exposição do excesso de galactose e metabólitos intra-útero; v) alteração no metabolismo do inositol (outra via alternativa à metabolização da galactose) (Holden, Rayment e Thoden, 2003) (Lai et al., 2008).

No entanto, pouco se sabe sobre os mecanismos pelos quais a galactose exerce esses efeitos. O objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos da galactose, o principal metabólito acumulado na galactosemia, sobre a atividade da enzima acetilcolinesterase, na tentativa de esclarecer os mecanismos fisiopatológicos que levam ao dano cerebral apresentado por pacientes acometidos por galactosemia.

MATERIAL E MÉTODOS

Reagentes

Todos os reagentes foram obtidos da empresa Sigma (St. Louis, MO, USA). A galactose foi dissolvida no dia dos experimentos e o pH da solução foi ajustado para 7.

Animais

Cinco ratos Wistar machos de 30 dias de vida foram obtidos do Biotério Central da Universidade do Extremo Sul Catarinense were used. Os animais foram mantidos com as mães até os 21 dias de vida, no momento do desmame. Os animais tiveram acesso livre à água e a uma ração comercial padrão e foram mantidos em ambiente climatizado, com temperatura constante ($22\pm 1^{\circ}\text{C}$), em um ciclo de 12:12 horas claro-escuro. Os Princípios de Cuidados Animais para Laboratório (Principles of Laboratory Animal Care; NIH publication n° 80-23, revised 1996) foram seguidas durante os experimentos. Todos os esforços foram realizados com o intuito de minimizar o sofrimento animal utilizados. O presente trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade do Extremo Sul Catarinense.

Preparo da Amostra

Os animais sofreram eutanásia por decapitação com guilhotina e sem anestesia, a caixa craniana foi aberta e o seu conteúdo retirado e, a partir de então, mantido sobre uma placa de vidro a aproximadamente 0 °C. O bulbo olfatório e o tronco cerebral foram desprezados. O córtex cerebral, foi isolado e limpo limpos, sendo retirado o excesso de sangue dos vasos externos e a substância branca das vias descendentes. As estruturas foram homogeneizadas em tampão tampão fosfato de potássio 150 mM contendo Triton X-100 1%, pH 7,5, e a seguir centrifugadas a 1000 x g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e incubado por 60 minutos a 37°C na ausência (controle) ou presença de diferentes concentrações de galactose (0,01; 0,5; 1,0; 5,0 ou 10 mM). Após a incubação, determinou-se a atividade da enzima acetilcolinesterase.

Determinação da atividade da enzima acetilcolinesterase

A atividade da enzima acetilcolinesterase foi realizada de acordo com o método descrito por Ellman et al. (1961). Avaliou-se a hidrólise da acetilcolina em uma concentração de 0,8 mM em 1 mL de uma solução contendo 100 mM de tampão fosfato, pH 7,5, e 1 mM de DTNB. Cinquenta microlitros de amostra foram adicionados à solução e pré-incubados por 3 minutos a 25°C. A hidrólise foi monitorada pela formação do ânion tiolato de DTNB a 412 nm por 3 minutos em intervalos de 30 segundos a 25°C. As amostras foram avaliadas em duplicatas e os resultados foram expressos em $\text{nmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$.

RESULTADOS

As amostras foram incubadas por sessenta minutos na presença de diferentes concentrações de galactose (0,1; 0,5; 1; 5 ou 10 mM) antes da determinação da atividade enzimática da acetilcolinesterase. Pode-se observar na Figura 1 que a galactose *in vitro* nas concentrações 0,1 a 1 mM não exerceu nenhum efeito sobre a atividade desta enzima. Entretanto, nas concentrações de 5 e 10 mM, a galactose induziu um aumento significativo da atividade da acetilcolinesterase [$F(5,29)=52,78$; $P<0,001$].

DISCUSSÃO

Os sintomas agudos da galactosemia aparecem já nos primeiros dias de vida, incluindo disfunção hepática, catarata, sepse, hipotonia, letargia, vômitos e diarreia. Entretanto, essa sintomatologia desaparece com restrição de galactose na dieta. Os achados clínicos mais proeminentes e persistentes estão relacionados ao sistema nervoso central, tais como alterações cognitivas, retardo mental e danos neurológicos graves, e podem ser observados mesmo com diagnóstico precoce e tratamento (Fridovich-Keil e Walter, 2001). Acredita-se que estas alterações comecem ainda *in utero* e se devam à exposição crônica à galactose endógena (Fridovich-Keil e Walter, 2001).

Até o presente momento, pouco se sabe sobre os efeitos tóxicos dos metabólitos acumulados na galactosemia. Woolley e Gommi (1964) demonstraram que altas concentrações de galactose inibem a síntese de receptores de serotonina, fato que poderia estar relacionado ao grave retardo mental apresentado por pacientes afetados pela galactosemia. Friedman e colaboradores (1989) demonstraram que células de Purkinje parecem ser as mais sensíveis à toxicidade da galactose, a qual diminuiria o número de células viáveis, sem apontarem os mecanismos que levariam a tal efeito. Também se observou uma diminuição da neurogênese hipocampal na presença de galactose em culturas celulares, e que esta diminuição foi prevenida pela adição de gangliosídeo GM1 (Zhang et al., 2005a,b).

Considerando que os mecanismos fisiopatológicos que levam aos danos ao sistema nervoso central presentes nos pacientes galactosêmicos ainda não estão definidos, o presente trabalho avaliou o efeito *in vitro* da galactose sobre a atividade da enzima acetilcolinesterase em córtex cerebral de ratos jovens, na tentativa de identificar tais mecanismos. Observamos que a galactose, quando presente em altas concentrações (5 e 10 mM), aumentou a atividade desta enzima. Por outro lado, concentrações baixas e intermediárias desse monossacarídeo não interferiram na atividade desta enzima.

A acetilcolina é um neurotransmissor que atua em estruturas cerebrais, incluindo córtex cerebral e hipocampo, e influencia diversos processos, como o controle motor e os processos de cognição. A acetilcolinesterase é uma enzima envolvida na degradação deste neurotransmissor em colina e acetato na fenda sináptica, sendo, assim, responsável pelo término do efeito do mesmo (Rang e Dale). Considerando que esta enzima apresenta uma alta atividade catalítica (hidrólise de aproximadamente 25 000 moléculas por segundo), mesmo alterações parciais da atividade desta enzima podem levar a efeitos pronunciados nos níveis de acetilcolina na fenda sináptica. Além disso, nossos resultados demonstrando que a

administração de galactose em ratos jovens provoca alterações no sistema colinérgico estão de acordo com um estudo previamente publicado na literatura internacional, que mostra uma alteração no conteúdo imunohistoquímico da enzima colina acetiltransferase, que é responsável pela síntese de acetilcolina, após a administração deste monossacarídeo por 6 semanas (Lei et al., 2008).

Apensar da principal função da acetilcolinesterase ser a hidrólise de acetilcolina, foi demonstrado também que essa enzima apresenta outras funções não catalíticas, incluindo o aumento do desenvolvimento neurítico (Grisaru et al., 1999; Greenfield et al., 2008), que não é impedido pela presença de inibidores da acetilcolinesterase, além de influenciar nos processos migração celular (Small et al., 1996).

Concluindo, os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que a galactose provoca um aumento na atividade da enzima acetilcolinesterase. Caso estes achados possam ser extrapolados para a condição humana, pode-se esperar que a ativação da enzima acetilcolinesterase possa estar envolvida na fisiopatologia do dano cerebral apresentado pelos pacientes acometidos pela galactosemia.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho teve apoio financeiro de projetos aprovados PIBIC/UNESC e Conselho Nacional de Ciência e Tecnologia (CNPq).

REFERÊNCIAS

*Artigo de revista

Bosch AM, Groothuis MA, Bakker HD, Heijmans HSA, Wijburg FA, Last BF. Living With Classical Galactosemia: Health-Related Quality of Life Consequences. *Pediatrics*. 113: 423-428, 2004.

Ellman GL, Courtney KD, Andres V Jr, Feather-Stone RM. [A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity](#). *Biochem Pharmacol*. 7:88-95, 1961.

Friedman JH, Levy HL, Boustany RM. Late onset of distinct neurologic syndromes in galactosemic siblings. *Neurology* 39:741–742, 1989.

Greenfield S. A., Zimmermann M. and Bond C. E. (2008) Non-hydrolytic functions of acetylcholinesterase. The significance of C-terminal peptides. *FEBS J*. 275, 604–611.

Grisaru D., Sternfeld M., Eldor A., Glick D. and Soreq H. (1999) Structural roles of acetylcholinesterase variants in biology and pathology. *Eur. J. Biochem*. 264, 672–686.

Lai K, Elsas LJ, Wiereng KJ. Galactose Toxicity in Animals. *IUBMB Life* 61: 1063-1074, 2009.

Lai K, Elsas LJ, Wiereng KJ. Galactose Toxicity in Animals. *IUBMB Life* 61: 1063-1074, 2009.

Lai K, Tang M, Yin X, Klapper H, Wierenga K, Elsas LJ. ARHI: A new target of galactose toxicity in Classic Galactosemia. *Biosci Hypotheses* 1:263-261, 2008.

Lai K, Tang M, Yin X, Klapper H, Wierenga K, Elsas LJ. ARHI: A new target of galactose toxicity in Classic Galactosemia. *Biosci Hypotheses* 1:263-261, 2008.

Lei M, Su Y, Hua X, Ding J, Han Q, Hu G, Xiao M. Chronic systemic injection of D-galactose impairs the septohippocampal cholinergic system in rats. *Neuroreport*. 2008 Oct 29;19(16):1611-5.

Mumma JO, Chhay JS, Ross KL, Eaton JS, Newell-Litwa KA, Fridovich-Keil JL. Distinct Roles of Galactose- 1P in Galactose Mediated Growth Arrest of Yeast Deficient in Galactose-1P Uridyltransferase (GALT) and UDP-Galactose 4'- Epimerase (GALE). *Mol Genet Metab* 93:160-171, 2008.

Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. (Eds). *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 8^a edition. New York, McGraw-Hill, pp. 3-45, 2001.

Small D. H., Michaelson S. and Sberna G. (1996) Non-classical actions of cholinesterases: role in cellular differentiation, tumorigenesis and Alzheimer's disease. *Neurochem. Int*. 28, 453–483.

Wiereng KJ, Lai K, Buchwald P, Tang M. High-Throughput Screening for Human Galactokinase Inhibitors. *J Biomol Screen* 13:415-423, 2008.

Zhang Q, Huang Y, Li X, Cui X, Zuo P, Li J. GM1 ganglioside prevented the decline of hippocampal neurogenesis associated with D-galactose. *Neuroreport* 16:1297–1301, 2005b.

Zhang Q, Li X, Cui X, Zuo P. D-galactose injured neurogenesis in the hippocampus of adult mice. *Neurol Res* 27:552–556, 2005a.

*Livro

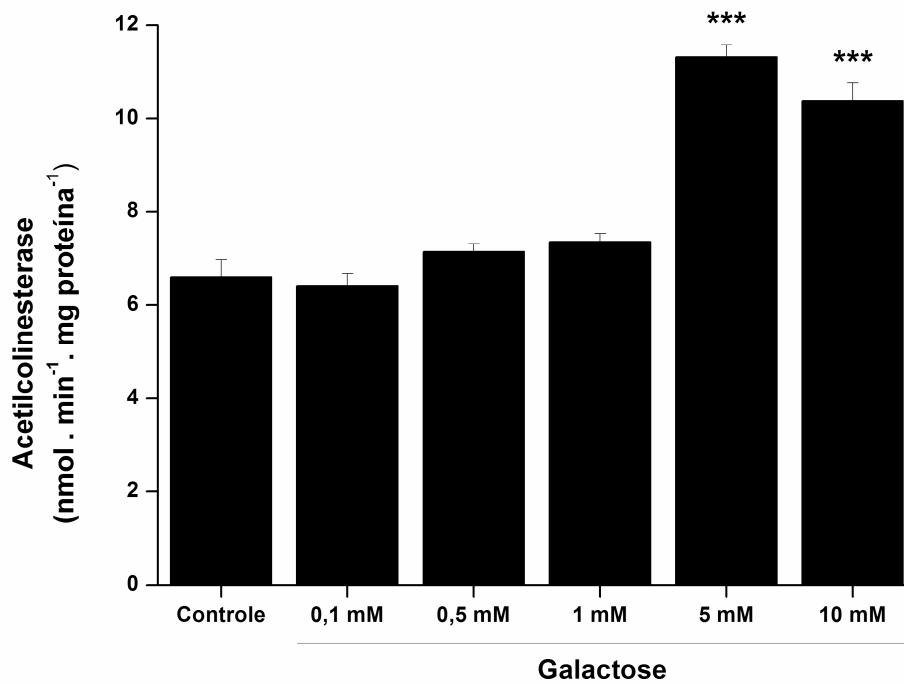
Camello JS Jr, Fernandes MIM, Maciel LMZ, Scrideli CA, Santos JLF, Camargo AS Jr, Passador CS, Leite PC, Resende DR, Souza LO, Giugliani R, Jorge SM. Galactosaemia in a Brazilian population: High incidence and cost-benefit analysis. *J Inherit Metab Dis*, 2009, *In press*.

Holden HM, Rayment I, Thoden JB. Structure and Function of Enzymes of the Leiloir Pathway for Galactose Metabolism. *J Biol Chem* 278:43885-43888, 2003.

Rang, H. P.; Dale, M. Maureen. *Farmacologia*. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, c1993. 595 p. ISBN 85

Legenda da Figura

Figura 1 - Efeito *in vitro* da galactose sobre atividade da enzima acetilcolinesterase em córtex cerebral de ratos jovens e adultos. Os dados representam média \pm desvio padrão da média de cinco experimentos independentes realizados em triplicata e estão expressos em $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$. *** $P < 0,001$ comparado ao controle (ANOVA).



ANEXO I – INSTRUÇÕES PARA AUTORES

Periódico Metabolic Brain Disease

Instructions for Authors

Types of papers

Neurochemical Research publishes papers that conform to any of the following categories:

- Original Articles reflect results of original research, and may be of any length but should not usually exceed 8000 words
- Overviews present state-of-the-art updates of a particular facet of neurochemistry. The manuscript should be organized according to key topics of the area being summarized instead of the usual Introductions, Experimental Procedures, and etc. The length should not exceed 20 pages including figures and the Overview should conclude with a section "Future Directions" which will summarize, in the authors' opinion, the direction the field is headed and what unanswered questions still need to be addressed. References should not be exhaustive, only key references need to be cited.
- Comments include the description of a method, the use of a method, or the discussion of a matter of interpretation and should not exceed 1500 words.

Papers should be as brief as is consistent with clear presentation. Preliminary communications are not accepted.

Manuscript submission

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Authors should submit their manuscripts online. Electronic submission substantially reduces the editorial processing and reviewing times and shortens overall publication times. Please follow the hyperlink "Submit online" on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

Title page

Title Page

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

Text

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.

Note: If you use Word 2007, do not create the equations with the default equation editor but use the Microsoft equation editor or MathType instead.

- Save your file in doc format. Do not submit docx files.
- [Word template \(zip, 154 kB\)](#)

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

- [LaTeX macro package \(zip, 182 kB\)](#)

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the reference list. The names of funding organizations should be written in full.

Scientific style

- Please always use internationally accepted signs and symbols for units (SI units).
- Nomenclature: Insofar as possible, authors should use systematic names similar to those used by Chemical Abstract Service or IUPAC.
- Genus and species names should be in italics.
- Generic names of drugs and pesticides are preferred; if trade names are used, the generic name should be given at first mention.
- Please use the standard mathematical notation for formulae, symbols, etc.:

Italic for single letters that denote mathematical constants, variables, and unknown quantities

Roman/upright for numerals, operators, and punctuation, and commonly defined functions or abbreviations, e.g., cos, det, e or exp, lim, log, max, min, sin, tan, d (for derivative)

Bold for vectors, tensors, and matrices.

References

Citation

Reference citations in the text should be identified by numbers in square brackets. Some examples:

1. Negotiation research spans many disciplines [3].
2. This result was later contradicted by Becker and Seligman [5].
3. This effect has been widely studied [1-3, 7].

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

The entries in the list should be numbered consecutively.

- Journal article

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 341:325–329

- Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. doi:10.1007/s001090000086

- Book

South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London

- Book chapter

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

- Online document

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

- Dissertation

Trent JW (1975) Experimental acute renal failure. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

- www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

- [EndNote style \(zip, 2 kB\)](#)

Authors preparing their manuscript in LaTeX can use the bibtex file spbasic.bst which is included in Springer's LaTeX macro package.

Tables

- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

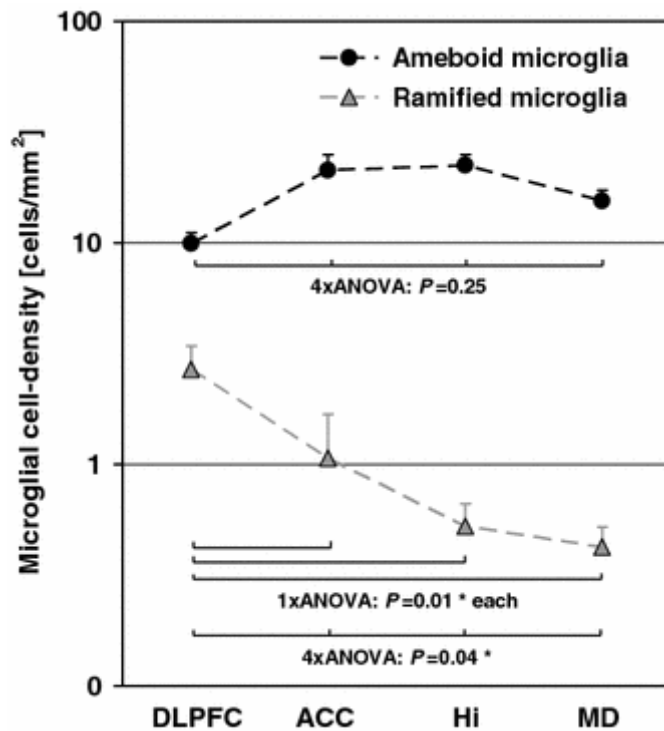
Artwork

For the best quality final product, it is highly recommended that you submit all of your artwork – photographs, line drawings, etc. – in an electronic format. Your art will then be produced to the highest standards with the greatest accuracy to detail. The published work will directly reflect the quality of the artwork provided.

Electronic Figure Submission

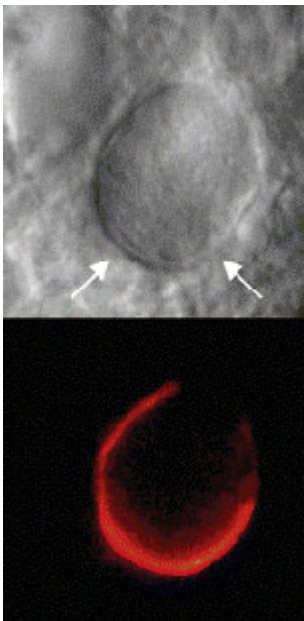
- Supply all figures electronically.
- Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MS Office files are also acceptable.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
- Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

Line Art



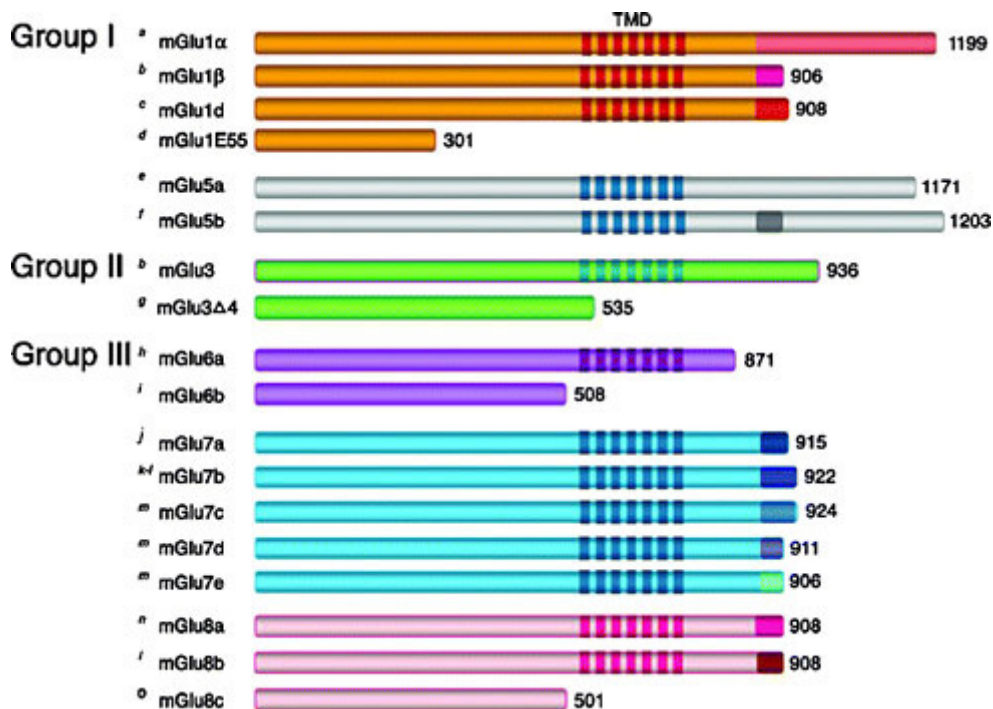
- Definition: Black and white graphic with no shading.
- Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
- All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Halftone Art



- Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.
- If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.
- Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

Combination Art



- Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.
- Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

Color Art

- Color art is free of charge for online publication.
- If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.
- If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.
- Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

- To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).
- Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).
- Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.
- Avoid effects such as shading, outline letters, etc.

- Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

- All figures are to be numbered using Arabic numerals.
- Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.
- Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).
- If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

Figure Captions

- Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.
- Figure captions begin with the term Fig. in bold type, followed by the figure number, also in bold type.
- No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
- Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.
- Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

- When preparing your figures, size figures to fit in the column width.
- For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.
- For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

- All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)

- Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (color-blind users would then be able to distinguish the visual elements)
- Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

Electronic Supplementary Material

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

Submission

- Supply all supplementary material in standard file formats.
- Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.
- To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

Audio, Video, and Animations

- Always use MPEG-1 (.mpg) format.

Text and Presentations

- Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.
- A collection of figures may also be combined in a PDF file.

Spreadsheets

- Spreadsheets should be converted to PDF if no interaction with the data is intended.
- If the readers should be encouraged to make their own calculations, spreadsheets should be submitted as .xls files (MS Excel).

Specialized Formats

- Specialized format such as .pdb (chemical), .wrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

Collecting Multiple Files

- It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

Numbering

- If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.

- Refer to the supplementary files as “Online Resource”, e.g., "... as shown in the animation (Online Resource 3)", "... additional data are given in Online Resource 4”.
- Name the files consecutively, e.g. “ESM_3.mpg”, “ESM_4.pdf”.

Captions

- For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

Processing of supplementary files

- Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that

- The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material
- Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

ANEXO II: PROJETO DE PESQUISA

UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
UNIDADE ACADÊMICA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE FARMÁCIA

JUSSARA PANATTO DAROS

**ALTAS CONCENTRAÇÕES DE GALACTOSE AUMENTAM A ATIVIDADE DA
ENZIMA ACETILCOLINESTERASE EM CÓRTEX CEREBRAL *IN VITRO***

CRICIÚMA, JUNHO DE 2011

JUSSARA PANATTO DAROS

**ALTAS CONCENTRAÇÕES DE GALACTOSE AUMENTAM A ATIVIDADE DA
ENZIMA ACETILCOLINESTERASE EM CÓRTEX CEREBRAL *IN VITRO***

Trabalho de conclusão de curso, apresentado para
obtenção do grau de farmacêutico no curso de farmácia
da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC.

Orientadora: Patricia Schuck

CRICIÚMA, JUNHO DE 2011

1 INTRODUÇÃO

A galactosemia é um erro inato do metabolismo dos carboidratos, de herança autossômica recessiva, causado pela deficiência de uma das três enzimas envolvidas no metabolismo da galactose: galactosequinase (GALK), galactose-1-fosfato uridiltransferase (GALT) e UDP-galactose-4-epimerase (GALE) (Holden, Rayment e Thoden, 2003).

Acúmulo de galactose é visto nos três tipos de galactosemia. Entretanto, acúmulo de galactose-1-fosfato ocorre somente nas deficiências de GALT e de GALE. Por outro lado, na deficiência de GALK também há aumento de galactitol e galactonato (Lai et al, 2009).

Atualmente, cinco mecanismos têm sido propostos para explicar a fisiopatologia da galactosemia em nível celular: i) o acúmulo de metabólitos após o bloqueio das reações catalisadas pelas enzimas GALK, GALT, ou GALE; ii) acúmulo de produtos tóxicos alternativos do catabolismo da galactose; iii) deficiência de UDP-galactose, levando à diminuição da biossíntese de glicoproteínas e glicolípidos; iv) toxicidade pré-natal, causada pela exposição do excesso de galactose e metabólitos intra-útero; v) alteração no metabolismo do inositol (outra via alternativa à metabolização da galactose) (Holden, Rayment e Thoden, 2003) (Lai et al., 2008).

Dados sobre a frequência de galactosemia variam conforme o local do estudo. Em Nova Iorque e Columbia Britânica, a prevalência é de aproximadamente 1:35.000 nascidos vivos (Camelo Jr. et al., 2009). Na Holanda, estima-se que a prevalência seja de 1:33.000 (Bosch et al., 2004), enquanto que na África, estima-se que a prevalência seja de 1:14.400 recém nascidos (Camelo jr. et al, 2009). No Brasil, há uma prevalência estimada de 1:20.000 nascidos vivos (Camelo Jr. et al, 2009).

As apresentações clínicas da galactosemia variam conforme a enzima defeituosa (ou ausente) na Via de Leloir. A mais comum e clinicamente mais grave forma de galactosemia é a galactosemia clássica, causada pela deficiência de GALT (Mumma et al, 2008). Na deficiência de GALK, o principal achado clínico é a catarata, geralmente bilateral, encontrada ainda em neonatos (Scriver et.al, 2001). Outras alterações têm sido descritas em decorrência da exposição prolongada ao excesso de galactose, tais como retardo mental, ataxia e dispraxia (Wiereng et al, 2008). Na deficiência de GALT, inicialmente os sintomas clínicos são perda de peso, vômitos, diarreia, hipotonia e letargia. Posteriormente, pode haver icterícia, hepatomegalia, insuficiência hepática, doença tubular renal, anormalidades hematológicas (anemia hemolítica) e septicemia (particularmente por *Escherichia coli*) (Camelo Jr. et al, 2009). Degeneração de células de Purkinje é observada no cerebelo (Lai et al, 2009). Os

achados clínicos da deficiência de GALE são semelhantes aos encontrados na deficiência de GALT (Lai et al, 2009).

Todo recém-nascido em que for detectada a galactosemia, independentemente da enzima deficiente, deve iniciar tratamento imediatamente, o qual consiste em eliminar qualquer ingestão de galactose no período de lactente, substituindo o leite materno, leite de vaca ou fórmulas infantis tradicionais por leite de soja ou fórmula elementar (leite livre de galactose), dando preferência pela última, tendo em vista que algumas fórmulas de soja contêm alguma porcentagem de galactose, evitando assim o acúmulo de metabólitos potencialmente tóxicos (Scriver et.al, 2001).

Mesmo após décadas de estudo das bases fisiopatológicas da galactosemia, muitas questões permanecem desconhecidas quanto à toxicidade da galactose e seus metabólitos (Mumma et al, 2008; Lai et al, 2009). Poucos estudos foram realizados com o intuito de demonstrar efeitos tóxicos da galactose e da galactose-1-fosfato. Woolley and Gommi (1964) demonstraram que um excesso de galactose inibe a síntese de receptores de serotonina, o que poderia estar relacionado ao grave retardo mental apresentado por pacientes afetados pela galactosemia. Um excesso de galactosemia também foi capaz de diminuir o número de células de Purkinje viáveis, entretanto os mecanismos pelos quais isso ocorre não foram descritos (Friedman et al., 1989). Também se observou uma diminuição da neurogênese hipocampal na presença de galactose, e que esta diminuição foi prevenida pela adição de ganglisídeo GM1 (Zhang et al., 2005a,b).

Entretanto, muito pouco se sabe sobre os efeitos que altas concentrações de galactose exercem no organismo. Portanto, faz-se necessária a realização de mais estudos sobre os efeitos da galactose sobre parâmetros bioquímicos em líquor e soro de ratos submetidos a um modelo experimental de galactosemia, na tentativa de procurar tratamentos mais adequados para melhorar a qualidade de vida dos pacientes afetados por essas doenças.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Avaliar os efeito *in vitro* através de parâmetros bioquímicos em líquido e soro de ratos submetido a um modelo experimental de galactosemia, na tentativa de procurar tratamentos mais adequados para melhorar a qualidade de vida dos pacientes afetados por essa doenças.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o modelo de galactosemia *in vitro* através da administração de galactose em ratos de 30 dias de vida;
- Desenvolver um modelo animal experimental através de testes com soro e líquido para melhores resultados sobre a galactosemia.
- Avaliar resultados encontrados com o modelo de galactosemia em diferentes parâmetros bioquímicos em líquido e soro de ratos submetidos a experimentos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Determinação da atividade da enzima acetilcolinesterase

A atividade da enzima acetilcolinesterase será realizada de acordo com o método descrito por Ellman et al. (1961). Será avaliada a hidrólise da acetilcolina em uma concentração de 0,8 mM em 1 mL de uma solução contendo 100 mM de tampão fosfato, pH 7,5, e 1 mM de DTNB. Cinquenta microlitros de amostra serão adicionados à solução e pré-incubados por 3 minutos a 25°C. A hidrólise será monitorada pela formação do ânion tiolato de DTNB a 412 nm por 3 minutos em intervalos de 30 segundos a 25°C. As amostras serão avaliadas em duplicatas e os resultados serão expressos em $\mu\text{mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$.

3.2 Cálculo do tamanho da amostra

Com base em estudos prévios em modelos animais *in vitro* para uma diferença de até 20% nos parâmetros a serem analisados entre os grupos, com uma variância de no máximo 10% entre as médias calculou-se um tamanho de amostra de 5 animais por grupo, para um erro alfa de 0,05 e um poder de 80%. Também se considerou o número de animais geralmente utilizados na literatura para análise de perfil bioquímica em animais.

3.3 Preparação da Amostra

Os animais sofrerão eutanásia por decapitação com guilhotina e sem anestesia para a coleta do sangue a ser analisado após uma hora da morte do animal. O sangue será retirado e parte será destinada à obtenção de soro através de centrifugação (4000 rpm por 10 minutos). O líquido será obtido através de punção na cisterna magna com uma agulha número 23. Os tecidos para parâmetros bioquímicos serão homogeneizados em tampão específico para cada técnica a ser realizada.

3.4 Análise estatística

A análise estatística utilizada será selecionada de acordo com o desenho experimental utilizado e com o tipo de distribuição apresentado pelo conjunto dos dados. Assumindo que os dados tenham uma distribuição normal, para comparação de três ou mais

médias será utilizada análise de variância (ANOVA) de uma via para análise dos dados obtidos na determinação dos efeitos bioquímicos das concentrações testados. Na comparação entre duas médias, será utilizado o teste *t* de *Student* para amostras independentes ou pareadas. Caso o conjunto dos dados a ser analisado apresente uma distribuição não-normal, os resultados serão analisados utilizando testes estatísticos não-paramétricos adequados ao desenho experimental utilizado. As análises estatísticas serão feitas pelo programa SPSS versão 16.0. Serão consideradas diferenças significativas quando o valor de $P \leq 0,05$.

3.5 Critérios para suspensão do estudo

Caso 60% dos animais morram antes do tempo determinado para a eutanásia dos animais, o presente estudo será suspenso. O estudo também será suspenso caso os animais apresentem alguma alteração na pele em decorrência das injeções ou caso demonstrem sofrimento.

4 CRONOGRAMA DE ATIVIDADES

A tabela abaixo resume o cronograma das atividades para o projeto ora proposto.

Atividades	2011		
	A	M	J
Revisão de Literatura	X		
Elaboração do Projeto de Pesquisa	X		
Encaminhamento do projeto de Pesquisa ao Comitê de Ética	X		
Qualificação do Projeto de Pesquisa	X		
Padronização dos Modelos Animais de Galactosemia		X	
Realização de Técnicas Bioquímicas		X	
Análise de Resultados		X	
Redação de Artigos Científicos e Comunicações em Congressos			X
Defesa do Trabalho de conclusão de curso em Ciências da Saúde			X

5 ORÇAMENTO

Material e Serviços		
- Animais	R\$ 8,00	R\$ 160,00
- Seringas	R\$ 0,75	R\$ 15,00
- Tubos descartáveis	R\$ 0,029	R\$ 29,00
- Vidrarias		R\$ 500,00
- Reagentes Químicos Gerais		R\$ 3.000,00
- Depreciação de Equipamentos		R\$ 1.000,00
Total		R\$ 4.704,00

REFERÊNCIAS

Bosch AM, Groothuis MA, Bakker HD, Heijmans HSA, Wijburg FA, Last BF. Living With Classical Galactosemia: Health-Related Quality of Life Consequences. *Pediatrics*. 113: 423-428, 2004.

Brazilian population: High incidence and cost-benefit analysis. *J Inher Metab Dis*, 2009, *In press*.

Camello JS Jr, Fernandes MIM, Maciel LMZ, Scrideli CA, Santos JLF, Camargo AS Jr, Passador CS, Leite PC, Resende DR, Souza LO, Giugliani R, Jorge SM. Galactosaemia in a Ellman GL, Courtney KD, Andres V Jr, Feather-Stone RM. [A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity](#). *Biochem Pharmacol*. 7:88-95, 1961.

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

Holden HM, Rayment I, Thoden JB. Structure and Function of Enzymes of the Leiloir Pathway for Galactose Metabolism. *J Biol Chem* 278:43885-43888, 2003.

Lai K, Elsas LJ, Wiereng KJ. Galactose Toxicity in Animals. *IUBMB Life* 61: 1063-1074, 2009.

Lai K, Elsas LJ, Wiereng KJ. Galactose Toxicity in Animals. *IUBMB Life* 61: 1063-1074, 2009.

Lai K, Tang M, Yin X, Klapper H, Wierenga K, Elsas LJ. ARHI: A new target of galactose toxicity in Classic Galactosemia. *Biosci Hypotheses* 1:263-261, 2008.

Lai K, Tang M, Yin X, Klapper H, Wierenga K, Elsas LJ. ARHI: A new target of galactose toxicity in Classic Galactosemia. *Biosci Hypotheses* 1:263-261, 2008.

Mumma JO, Chhay JS, Ross KL, Eaton JS, Newell-Litwa KA, Fridovich-Keil JL. Distinct Roles of Galactose-1P in Galactose Mediated Growth Arrest of Yeast Deficient in Galactose-1P Uridyltransferase (GALT) and UDP-Galactose 4'-Epimerase (GALE). *Mol Genet Metab* 93:160-171, 2008.

Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. (Eds). *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 8^a edition. New York, McGraw-Hill, pp. 3-45, 2001.

Wiereng KJ, Lai K, Buchwald P, Tang M. High-Throughput Screening for Human Galactokinase Inhibitors. *J Biomol Screen* 13:415-423, 2008.

Zhang Q, Huang Y, Li X, Cui X, Zuo P, Li J. GM1 ganglioside prevented the decline of hippocampal neurogenesis associated with D-galactose. *Neuroreport* 16:1297-1301, 2005b.

Zhang Q, Li X, Cui X, Zuo P. D-galactose injured neurogenesis in the hippocampus of adult mice. *Neurol Res* 27:552-556, 2005a.

UNIVERSIDADE DO EXTAMO SUL CATARINENSE
UNIDADE ACADÊMICA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE FARMÁCIA

ANEXO J: DECLARAÇÃO DE ANUÊNCIA

Eu, Patrícia Fernanda Schuck, orientador(a) do(a) acadêmico(a) Jussara Panatto Daros, declaro para os devidos fins que este(a) realizou as alterações penitentes no trabalho de conclusão de curso (TCC), instituído **Altas concentrações de galactose aumentam a atividade da enzima acetilcolinesterase em córtex de ratos jovens *in vitro*.**