

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

**FÁBIO ALMEIDA MORAIS**

**A ADMINISTRAÇÃO AGUDA DE D-GALACTOSE PROVOCA UM AUMENTO  
DEPENDENTE DE IDADE NA ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE EM  
CÓRTEX CEREBRAL DE RATOS**

**CRICIÚMA, DEZEMBRO DE 2011**

**FÁBIO ALMEIDA MORAIS**

**A ADMINISTRAÇÃO AGUDA DE D-GALACTOSE PROVOCA UM AUMENTO  
DEPENDENTE DE IDADE NA ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE EM  
CÓRTEX CEREBRAL DE RATOS**

Projeto de Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense para como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Patrícia F. Schuck

Co-orientador: Prof. Emilio L. Streck

**CRICIÚMA, DEZEMBRO DE 2011.**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

M827a      Morais, Fábio Almeida.

A administração aguda de D-Galactose provoca um aumento dependente de idade na atividade da acetilcolinesterase em córtex cerebral de ratos. / Fábio Almeida Morais ; orientador : Patrícia F. Schuck ; co-orientador : Emilio L. Streck. – Criciúma : Ed. do Autor, 2011.

61 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2011.

1. Erros inatos do metabolismo. 2. Galactosemias.  
3. Galactose. 4. Acetilcolinesterase. I. Título.

CDD. 22ª ed. 616.042



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC  
Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão  
Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde  
**Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)**  
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 1.919 de 03.06.2005

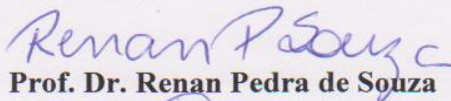
---

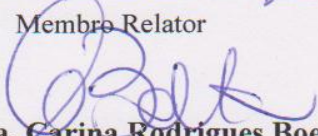
## PARECER

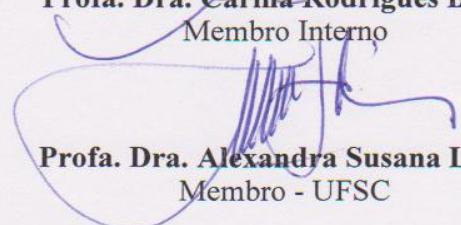
Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado) reuniram-se para realizar a arguição da Dissertação de MESTRADO apresentado pelo candidato **Fabio Almeida de Moraes** sob o título “**A administração aguda de D-galactose provoca um aumento dependente de idade na atividade da acetilcolinesterase em córtex cerebral de ratos**” para obtenção do grau de **MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE** do Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

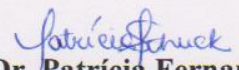
Após haver analisado o referido trabalho e argüido ao candidato, os membros são de parecer pela “**APROVAÇÃO**” da Dissertação, com conceito A.

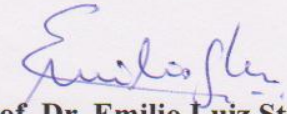
Criciúma, SC, 14 de dezembro de 2011

  
**Prof. Dr. Renan Pedra de Souza**  
Membro Relator

  
**Profa. Dra. Carina Rodrigues Boeck**  
Membro Interno

  
**Profa. Dra. Alexandra Susana Latini**  
Membro - UFSC

  
**Prof. Dr. Patrícia Fernanda Schuck**  
Orientador

  
**Prof. Dr. Emilio Luiz Streck**  
Coordenador do PPGCS

*Aos meus pais pelo amor, carinho e confiança incontestada depositada em mim, mostrando-me desde cedo o caminho do crescimento pessoal através da dedicação, trabalho e aquisição do conhecimento. À minha esposa pelo companheirismo, alicerçando e incentivando à realização dos meus sonhos.*

## RESUMO

Galactosemia é caracterizada pela deficiência em uma das três enzimas envolvidas no metabolismo da galactose, galactosequinase (GALK), galactose-1-fosfato-uridiltransferase (GALT) e galactose- difosfato-uridine 4 epimerase (GALE). Os principais achados clínicos são disfunções do sistema nervoso central com atraso de desenvolvimento, deficiência de aprendizagem e de memória, cuja fisiopatologia ainda não está esclarecida. Dessa forma, considerando que alterações na neurotransmissão colinérgica foram relacionadas á fisiopatologia de outros erros inatos do metabolismo e doenças neurodegenerativas, no presente trabalho avaliamos os efeitos *in vitro* e *in vivo* da galactose sobre a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) em diferentes estruturas de ratos ao longo do seu desenvolvimento. Observamos que a administração aguda de galactose não alterou a atividade da AChE em córtex cerebral, hipocampo ou estriado de ratos de 15 dias de vida. Por outro lado, quando administrada a animais com 30 e 60 dias de vida, a galactose provocou um aumento significativo da atividade da AChE em córtex cerebral. Por último, observamos que altas doses de galactose (5 mM e maiores) *in vitro* também provocam um aumento na atividade desta enzima em córtex cerebral de ratos de 30 dias de vida. Nossos resultados demonstram que a administração de galactose provoca um aumento na AChE de uma maneira idade-dependente em córtex cerebral de ratos. Dessa forma, podemos presumir que um desequilíbrio na homeostase colinérgica possa estar envolvido na fisiopatologia do dano cerebral observado em pacientes com galactosemia.

**Palavras-chaves:** galactose, galactosemia, acetilcolinesterase, cérebro

## ABSTRACT

Galactosemia is characterized by a deficiency in one of the three enzymes involved in the galactose metabolism galactosekinase (GALK), galactose-1-phosphate uridylyltransferase (GALT) and uridine-diphosphate-galactose 4 epimerase (GALE). The main clinical findings observed in patients affected by galactosemia include neurodevelopmental delay, and learning and memory disabilities, whose pathophysiology is still unclear. Therefore, considering that a disruption in cholinergic neurotransmission has been related to the pathophysiology of brain damage in neurodegenerative diseases and in other inborn errors of the metabolism, in the present work we investigated the *in vivo* and *in vitro* effect of galactose on acetylcholinesterase (AChE) activity in different brain structures of developing rats. It was observed that acute galactose administration did not alter AChE activity in cerebral cortex, hippocampus and striatum of suckling rats (15-day-old). On the other hand, when administered to older rats, galactose provoked a significant increase in AChE activity in cerebral cortex. Finally, it was observed that high doses of galactose (5 mM and higher) *in vitro* also provoked an increase in this enzyme activity in cerebral cortex of 30-day-old rats. Our data demonstrate that acute galactose administration provokes an age-dependent increase in AChE activity in cerebral cortex of rats. It may be therefore concluded that a disruption in cholinergic homeostasis may be involved in the pathophysiology of brain damage observed in patients affected by galactosemia.

**Keywords:** galactose; galactosemia; acetylcholinesterase; brain

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AchE - Acetilcolinesterase

EIM – Erros inatos do metabolismo

Gal – Galactose

GALE – Galactose uridine-difosfato 4 epimerase

GALK – galactosequinase

GALT- galactose-1-fosfato uridiltransferase

SNC – sistema nervoso central



## Sumário

PARTE I .....	10
1 INTRODUÇÃO .....	11
1.1 Erros Inatos do Metabolismo .....	11
1.2 Metabolismo da Galactose.....	12
1.3 Galactosemia .....	15
1.3.1 Apresentações Clínicas de Galactosemia .....	16
1.3.2 Diagnóstico.....	17
1.3.3 Tratamento .....	18
1.3.4 Fisiopatologia .....	18
1.4 Acetilcolina e Acetilcolinesterase .....	19
1.5 Acetilcolinesterase e erros inatos do metabolismo .....	23
2 OBJETIVOS .....	24
2.1 Objetivo Geral .....	24
2.2 Objetivos Especificos .....	24
PARTE II .....	26
Artigo submetido á publicação no periódico .....	27
PARTE III .....	47
3. DISCUSSÃO .....	48
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53

**PARTE I**

## **1 INTRODUÇÃO**

### **1.1 Erros Inatos do Metabolismo**

Muitos transtornos da infância são causados por mutações de genes que codificam proteínas específicas. Estas mutações podem resultar na alteração de estrutura da proteína principal ou da quantidade de proteína sintetizada. A capacidade funcional da proteína, seja ela uma enzima, um receptor, um veículo de transporte ou um elemento estrutural, pode ser relativa ou seriamente comprometida. Estes transtornos bioquímicos hereditários são denominados coletivamente de erros inatos do metabolismo (EIM) (Berhman et al, 2005). As consequências dos EIM podem ser o acúmulo de substâncias normalmente presentes em pequena quantidade, a deficiência de produtos intermediários críticos, a deficiência de produtos finais específicos ou ainda o excesso nocivo de produtos de vias metabólicas acessórias (Berhman et al, 2005).

Os EIM são classificados de acordo com o fenótipo clínico da doença em questão, sendo agrupado em três grupos específicos. O grupo I apresenta defeitos na síntese ou catabolismo de moléculas complexas, tendo como características sinais e sintomas permanentes e progressivos. São exemplos de doenças pertencentes ao grupo I as doenças lisossomais e peroxissomais. O grupo II apresenta um defeito no metabolismo intermediário caracterizando-se por intoxicações agudas ou crônicas, dependendo da exposição ao substrato ou metabólitos. As aminoacidopatias, acidúrias orgânicas, doenças do ciclo da ureia e intolerância aos açúcares (glicogenoses, Galactosemia, intolerância à frutose) fazem parte das doenças classificadas no grupo II. Já o

grupo III apresenta defeito na transformação e ou utilização de energia, caracterizando-se por distúrbios no metabolismo intermediário do fígado, músculo e cérebro; podemos citar como doenças pertencentes a este grupo as doenças de depósito de glicogênio, hiperlaticinemias congênitas, doenças mitocondriais e defeitos de  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos (Scriver et al 2001). No presente trabalho abordaremos sobre a Galactosemia, um EIM pertencente ao grupo II conforme citado anteriormente.

## 1.2 Metabolismo da Galactose

A D-galactose (Gal;  $C_6H_{12}O_6$ ) é um carboidrato simples (monossacarídeo) com grupo funcional aldeído, classificada como aldose, isômero da glicose e epímero desta no carbono 4. Sua obtenção se dá através da dieta alimentar em decorrência da quebra do dissacarídeo lactose no intestino delgado pela ação da enzima lactase, originando dois monossacarídeos, glicose e galactose, sendo assim absorvidas (Smith et al., 2005).

O intestino delgado está envolvido no fornecimento de açúcares para a circulação sistêmica através da absorção dos produtos resultantes da digestão dos carboidratos. Até o presente momento, foram descritos dois diferentes processos de absorção de glicose, galactose e frutose no intestino delgado, que são levadas para os enterócitos por transportadores específicos e deixam estas células através de um transportador glicose tipo 2 (GLUT 2) basolateral (Kellett GL & Brot-Laroche E, 2005; Kellett GL & Helliwell PA, 2000). Em estudos utilizando intestino delgado de Hamster, Crane e

colaboradores (1960) evidenciaram que ao aumentarem a concentração de glicose na porção mucosa e serosa do tecido, havia acúmulo do substrato no lado seroso. Este não foi o caso da frutose sendo, então, caracterizada como não dependente da concentração de substrato.

A hipótese original do co-transportador  $\text{Na}^+$ /glicose foi apresentada por Crane e colaboradores em 1960. A proteína descrita como responsável por manter o gradiente de  $\text{Na}^+$  nos enterócitos é o transportador  $\text{Na}^+$ /glicose dependente (GLUT 1) na membrana da borda em escova dos enterócitos. A identificação dos transportadores de glicose tipo 2 (GLUT 2) e transportadores de glicose tipo 5 (GLUT 5) e os aspectos moleculares do processo de absorção dos açúcares no intestino delgado forneceram evidências para a caracterização do transporte destes substratos do lúmen intestinal para a corrente sanguínea, onde o GLUT 1 ativa o transporte de glicose e galactose em toda a membrana da borda em escova (Hediger MA et al., 1987), e a frutose atravessa a membrana da borda em escova pelo facilitador de difusão GLUT 5 (Burant CF et al, 1992). O GLUT 2 apresenta uma baixa afinidade para o transporte destes açúcares na membrana basolateral dos enterócitos (Thorens B et al, 1980) (Figura 1).

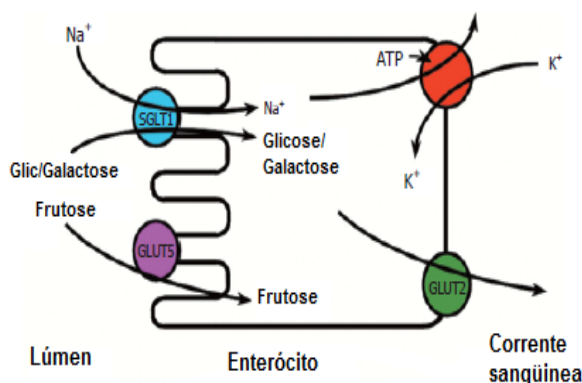


Figura 1 : esquematização absorção dos açúcares

Após a absorção na mucosa do intestino delgado, a Gal é metabolizada no fígado principalmente através da via de Leloir (Figura 2). No primeiro passo, a beta-D-galactose é epimerizada a alfa-D-galactose pela enzima galactose mutarotase (E.C. 5.1.3.3). O próximo passo é ATP-dependente, em que ocorre a fosforilação através da enzima galactoquinase (GALK, E.C. 2.7.1.6), formando galactose-1-fosfato (Gal-1-P). A terceira enzima do metabolismo da Gal é a Gal-1-P uridiltransferase (GALT, E.C. 2.7.7.12), que catalisa a transferência do grupo Uridinamono-fosfato (UMP) da Uridinadifosfato(UDP)-glicose para Gal-1-P, gerando assim glicose-1-fosfato e UDP-galactose. A via se completa através da enzima UDP-galactose-4-epimerase (GALE, E.C. 5.1.3.2), que converte UDP-galactose em UDP-glicose (Holden et al., 2003).

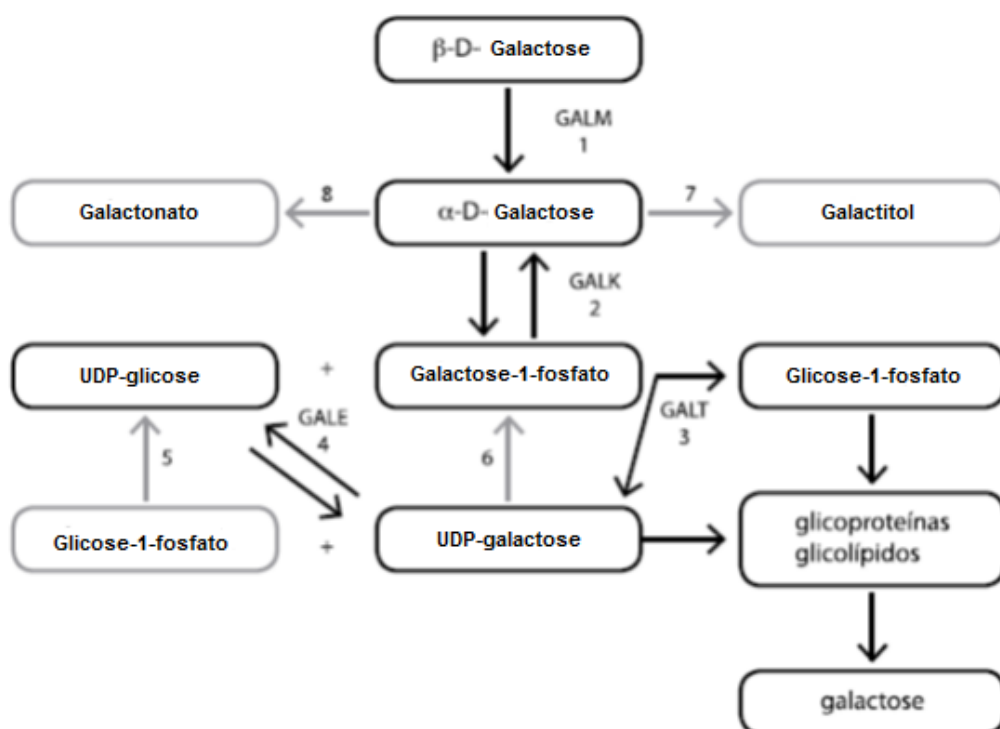


Figura 2. Apresentação da Via de Leloir. (1) galactose mutase, (2) galactoquinase (GALK), (3) galactose-uridiltransferase (GALT), (4) galactose epimerase (GALE), (5) Uridina-difosfato-glicose pirofosforilase, (6) Uridina-difosfato-glicose fosforilase, (7) Aldose redutase, (8) galactose desidrogenase, galactose-1-fosfato (gal-1-P), glicose -1-fosfato (glc-1-P), uridilfosfato-galactose (UDP-gal), uridilfosfato-glicose (UDP-glc).

Enquanto a via de Leloir é claramente a rota predominante do metabolismo da Gal em humanos e outras espécies, esta não é a única rota. Estudos em micro-organismos, camundongos e pacientes evidenciam a existência de outras rotas para o metabolismo da Gal, como a redução da Gal a galactitol pela enzima aldose redutase (E.C. 1.1.1.21) e a oxidação da Gal através da Gal desidrogenase (E.C. 1.1.1.19) formando galactonato (Scriver et.al, 2001). O galactitol não pode ser metabolizado, sendo predominantemente excretado na urina, e o excesso é acumulado no cristalino e outros tecidos. O galactonato é metabolizado pela via das pentoses-fosfato, sendo seu excesso tóxico (Lai et al, 2009).

### **1.3 Galactosemia**

A Galactosemia (OMIM 230400) é um EIM dos carboidratos, de herança autossômica recessiva, causado pela deficiência de uma das três enzimas envolvidas no metabolismo da Gal: GALK, GALT (Galactosemia clássica) e GALE (Holden et al., 2003). O acúmulo de Gal é observado nos três tipos de Galactosemia, mas o acúmulo de Gal-1-P 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 são 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 gal; III) deficiência de UDP-Gal, levando à diminuição da biossíntese de glicoproteínas

e glicolípideos; IV) toxicidade pré-natal, causada pela exposição a excesso de Gal e metabólitos intra-útero; V) alteração no metabolismo do inositol (outra via alternativa à metabolização da gal) (Holden et al.2003; Lai et al., 2008).

Dados sobre a frequência de Galactosemia variam conforme o local do estudo. Em Nova Iorque (Estados Unidos) e Columbia Britânica (Canadá), a prevalência é de aproximadamente 1:35.000 nascidos vivos, enquanto no Reino Unido, a prevalência encontrada foi de 1:60.000 (Holton et al., 2001). 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 (Elsas et al., 2011). No Brasil, há uma prevalência estimada de 1:20.000 nascidos vivos (Camelo Jr. et al, 2009).

### **1.3.1 Apresentações Clínicas de Galactosemia**

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). Alterações neurológicas descritas em decorrência da exposição prolongada ao excesso de gal, são retardo mental, comprometimento da aprendizagem e memória, 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).

### **1.3.2 Diagnóstico**

A Galactosemia clássica faz parte de programas de triagem neonatal em diversos países. Preferencialmente deve ser realizado antes dos cinco dias de vida, para prevenção da morbidade e mortalidade da doença (Bosh et al, 2006). No Brasil, Santa Catarina e Distrito Federal já possuem uma política de inclusão da Galactosemia no programa, utilizando kit laboratorial de detecção através de cromatografia colorimétrica, sendo utilizado como triagem com seus resultados positivos devendo ser confirmados por exames mais sensíveis (Camelo jr et al., 2009).

A Gal é um açúcar redutor que é prontamente excretado na urina, entretanto a determinação de substâncias redutoras na urina pode ser utilizada como um primeiro indicativo da doença, devendo ser utilizado após por outros métodos mais específicos para confirmar ou rejeitar o diagnóstico. Um exame mais específico mensurando a Gal e galactitol é a cromatografia gasosa determinando açúcares urinários ou álcoois (Bosch et al., 2006). O padrão ouro para determinação do diagnóstico de Galactosemia

clássica é através da mensuração da atividade da enzima GALT em isolados de eritrócitos (Shin-Buehring & Schaub, 1980).

### **1.3.3 Tratamento**

Todo recém-nascido em que for confirmada a Galactosemia, independentemente da enzima deficiente, deve iniciar tratamento imediatamente, o qual consiste em eliminar qualquer ingestão de Gal 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 gal, evitando assim o acúmulo de metabólitos potencialmente tóxicos (Scriver et.al, 2001).

### **1.3.4 Fisiopatologia**

A importância do metabolismo normal da Gal foi reconhecida há mais de trinta anos, quando pesquisadores reconheceram as quatro enzimas presentes na Via de Leloir (Holden et al., 2003). Mesmo após décadas de estudo das bases fisiopatológicas da Galactosemia, muitas questões permanecem desconhecidas quanto à toxicidade da Gal e seus metabólitos (Mumma et al, 2008; Lai et al, 2009).

Woolley and Gommi (1964) demonstraram que um excesso de Gal 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 Gal também diminuiu o número de células de Purkinje viáveis, entretanto os mecanismos pelos quais isso ocorre não foram descritos (Friedman et al., 1989). Também se observou em camundongos adultos uma diminuição da neurogênese hipocampal na presença de Gal, e que esta diminuição foi prevenida pela adição de gangliosídeo GM1 (Zhang et al., 2005a,b).

#### **1.4 Acetilcolina e Acetilcolinesterase**

Há aproximadamente cem anos, a acetilcolina foi proposta como agente químico responsável pela transmissão nervosa em sinapses. Desde então, a transmissão colinérgica tem sido base de estudos em neurociências (Anglade & Larabi-Godinot, 2010).

A acetilcolina foi reconhecida por Loewi (1921) em experimentos relacionados ao estímulo do nervo vago e sua atividade no músculo cardíaco. Essa molécula também foi reconhecida como neurotransmissor de fibras pós-ganglionares parassimpática, fibras pré-ganglionares autonômicas, terminações de nervos motores e provavelmente algumas comunicações no sistema nervoso central (Anglade & Larabi-Godinot, 2010).

A síntese de acetilcolina foi observada pela primeira vez em 1943 (figura 3) por Nachmansohn e Machado, quando foi identificada a enzima acetilcolina transferase (E.C 2.3.1.6), responsável por catalisar a reação de formação da acetilcolina quando da ligação dos substratos colina e acetil-coenzima A ao neurônio pré-sináptico (Anglade & Larabi-Godinot, 2010).

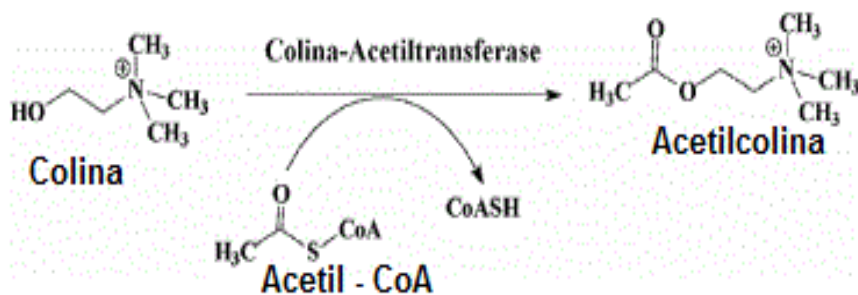


Figura 3 – Representação estrutural da reação de formação da acetilcolina catalisada pela acetilcolina transferase (Viegas jr C. et al., 2004).

Durante o entendimento das funções das sinapses colinérgicas, foi observada uma rápida inativação da acetilcolina após ocorrer estimulação nervosa. Tal fato sugeriu que a degradação enzimática do transmissor era essencial para a fina regulação da transmissão nervosa, sendo proposta esta ação pela enzima acetilcolinesterase (AChE; E.C 3.1.1.7) (Figura 4) em 1949, quando Koelle e Friedenvald identificaram a atividade da esta enzima *in situ*. (Anglade & Larabi-Godinot, 2010).

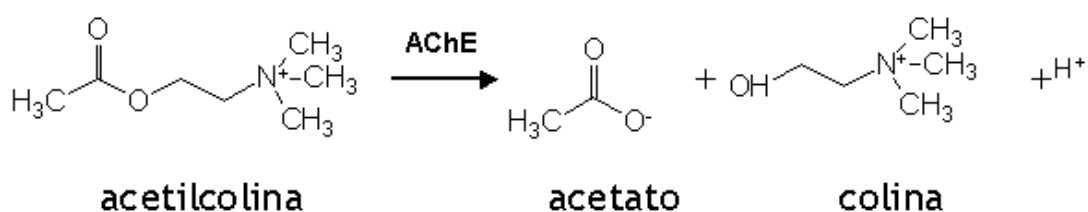


Figura 4 – Representação estrutural da reação de degradação mediada pela AChE. (fonte: <http://www2.bioqmed.ufrj.br/enzimas/inibidores.htm>)

A AChE é uma importante enzima no controle da transmissão dos impulsos nervosos através das sinapses colinérgicas, hidrolisando a acetilcolina a acetil-CoA e colina (Figura 5) (Müller et al., 2002). A AChE está

implicada em funções cognitivas e provavelmente envolvidas em doenças neurodegenerativas, tais como a doença de Alzheimer (Law et al., 2001), em que ocorre uma diminuição da atividade neurotransmissora da acetilcolina através da diminuição deste neurotransmissor na fenda sináptica, além do aparecimento de placas de substância amiloide no tecido cerebral (Talesa , 2001). Nos pacientes com doença de Alzheimer há uma perda de neurônios do hipocampo e do córtex cerebral, o que possivelmente leva ao comprometimento da memória e da capacidade cognitiva com preservação da atividade motora do indivíduo no início da evolução da doença (Talesa, 2001). A abordagem do tratamento da doença de Alzheimer tem como foco a manutenção dos níveis de acetilcolina na fenda sináptica. Inicialmente, tentou-se a administração de acetilcolina nos pacientes, mas sua efetividade encontrou problemas devido aos achados de sua ação a nível periférico, como no nervo vago, e sua atividade depressora do cronotropismo cardíaco, lembrando que as sinapses colinérgicas não ocorrem exclusivamente no SNC. Uma abordagem posterior e mais efetiva ocorreu após a descoberta da atividade da AchE, levando ao desenvolvimento de fármacos capazes de inibir a atividade desta enzima. Dessa forma, haveria uma diminuição na taxa da hidrólise da acetilcolina na fenda sináptica, aumentando a possibilidade de uma neurotransmissão efetiva (Goodman & Gilman, 2006).

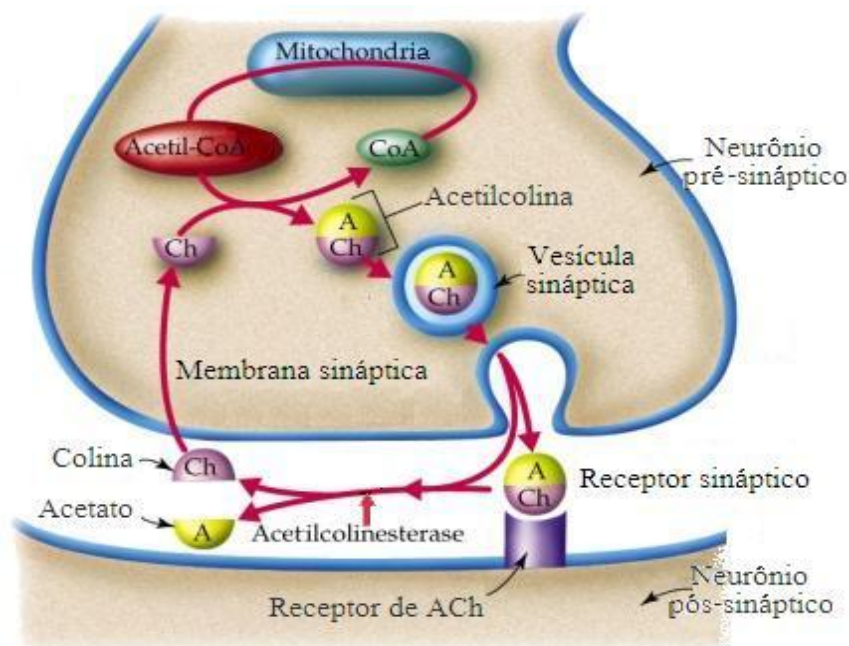


Figura 5. Esquema representando o metabolismo da acetilcolina, catalisada pela acetilcolina transferase no neurônio pré-sináptico e sua degradação na fenda sináptica pela acetilcolinesterase. Fonte: <http://lct.nutes.ufrj.br/toxicologia/bancol/Sinapse%20colinergica%202.JPG>

JPG

As colinesterases são classificadas em hidrolases de serina e hidrolases de ésteres de colina com eficiências diversas (Talesa, 2001). Em mamíferos, há duas classes de colinesterases: AchE e butirilcolinesterase (E.C. 3.1.1.8); estas distintas enzimas possuem diferenças de distribuição em tecidos, propriedades cinéticas, especificidade para substratos e inibidores seletivos naturais ou sintéticos (Müller et al., 2002). Nos humanos, a AchE é mais abundante no SNC, placas motoras dos músculos esqueléticos e membrana dos eritrócitos (Talesa et al., 2001; Müller et al., 2002). Biologicamente, a função da butirilcolinesterase não está clara, sendo mais abundante do soro (Talesa et al., 2001; Müller et al., 2002). A inibição da AchE resulta em um acúmulo da acetilcolina, com aumento do sinal e hiperatividade colinérgica,

incluindo convulsões e *status epilepticus*, podendo levar a um grave dano e à morte neuronal (Gupta et al., 2001).

### **1.5 Acetilcolinesterase e erros inatos do metabolismo**

Alguns EIM apresentam sinais e sintomas relacionados à disfunção neuronal, tal como a Galactosemia (Ratnakumari et al, 1995; Schulpis et al, 2006). O papel da atividade colinérgica tem sido alvo de pesquisa em doenças com manifestações neurológicas referentes á alteração da atividade motora, comportamento, aprendizagem e memória, devido à ação da acetilcolina como neurotransmissor no controle da excitabilidade no SNC (Anglade & Larabi-Godinot,2010). Na fenilcetonúria, EIM com manifestações clínicas importantes do SNC provocado por uma deficiência na via catabólica do aminoácido fenilalanina, foi observada um decréscimo da atividade da enzima AchE em membranas de eritrócitos de pacientes sem controle dietético adequado (Tsakiris et al.,2002). Em ratos geneticamente modificados para reproduzir a deficiência de ornitina transcarbamilase, outro exemplo de EIM, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas na atividade de AchE, quando comparadas ao grupo controle (Ratnakumari et al., 1995). Na homocistinúria, em que ocorre uma elevação dos aminoácidos homocisteína e metionina e a apresentação clínica neurológica manifesta-se com retardo mental e convulsões, foi demonstrado que a administração combinada destes compostos provoca um aumento da AchE em cérebro de ratos (Schulpis et al., 2006). Também foi demonstrado na deficiência de guanidinoacetato metiltransferase, caracterizada por um acúmulo de guanidinoacetato, depleção de creatina e comprometimento do SNC, que o principal metabólito acumulado

nesta doença provoca um aumento da atividade desta enzima *in vivo* (Zugno et al., 2008). Muitos estudos de doenças metabólicas tem mostrado uma associação entre o acúmulo de substratos ou metabólitos no SNC e alteração da atividade da enzima AchE, sugerindo a possibilidade de haver uma interferência na neurotransmissão colinérgica na fisiopatologia dos EIM (Stefanello et al, 2003; Zugno et al, 2008).

Tendo em vista a importância da acetilcolina na fisiologia do SNC e o desconhecimento do mecanismo fisiopatológico que a Gal e seus possíveis metabólitos exercem efeitos deletérios no SNC, torna-se necessária a realização de mais estudos sobre parâmetros bioquímicos no SNC, na tentativa de procurar estratégias terapêuticas mais adequadas para melhorar a da qualidade de vida dos pacientes afetados por Galactosemia.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Avaliar os efeitos *in vitro* e *in vivo* da Gal sobre a atividade da enzima AchE em córtex cerebral, estriado, hipocampo de ratos ao longo do seu desenvolvimento.

### **2.2 Objetivos Específicos**



- Estabelecer um modelo de Galactosemia através da administração subcutânea de Gal em ratos de 15, 30, 60 dias de vida;
- Avaliar o efeito *in vivo* da administração aguda de Gal (5 $\mu$ mol/g) sobre atividade da enzima AchE em córtex cerebral, hipocampo e estriado de ratos durante o período de amamentação (15 dias de vida);
- Avaliar o efeito *in vivo* da administração aguda de Gal (5 $\mu$ mol/g) sobre atividade da enzima AchE em córtex cerebral de ratos jovens (30 e 60 dias de vida);
- Avaliar o efeito *in vitro* de diferentes concentrações de D-galactose (0,1- 0,5 – 1 - 5 - 10 mM), sobre atividade da enzima AchE em córtex cerebral de ratos de 30 dias de vida.

**PARTE II**

**Artigo submetido á publicação no periódico  
“*Neurochemical Research*”**

**Acute D-galactose administration enhances acetylcholinesterase activity  
in cerebral cortex of rats in an age-dependent manner**

Fabio Almeida Morais, Liliane Borges Rodrigues, Fernando Viana Ghedim,  
Daiane Bittencourt Fraga, Samara Fenilli Bristot, Emilio Luiz Streck, Gustavo da  
Costa Ferreira, Alexandra Ioppi Zugno,  
Patrícia Fernanda Schuck

**Acute D-galactose administration enhances acetylcholinesterase activity  
in cerebral cortex of rats in an age-dependent manner**

Fabio Almeida Morais<sup>1</sup>, Liliane Borges Rodrigues<sup>1</sup>, Fernando Viana Ghedim<sup>2</sup>,  
Daiane Bittencourt Fraga<sup>2</sup>, Samara Fenilli Bristot<sup>1</sup>, Emilio Luiz Streck<sup>3</sup>, Gustavo  
da Costa Ferreira<sup>1</sup>, Alexandra Ioppi Zugno<sup>2</sup>,  
Patrícia Fernanda Schuck<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>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, Criciúma, SC, Brazil; <sup>2</sup>Laboratório de Neurociências, Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, SC, Brazil; <sup>3</sup>Laboratório de Bioenergética, Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, SC, Brazil.

**\*Corresponding Author:** Patrícia F. 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

**Abstract**

**Introduction:** Galactosemia is characterized by a deficiency in one of the three enzymes involved in the galactose metabolism galactosekinase (GALK), galactose-1-phosphate uridyltransferase (GALT) and uridine-diphosphate-galactose 4 epimerase (GALE). The main clinical findings observed in patients affected by Galactosemia include developmental delay, and learning and memory disabilities, whose pathophysiology is still unclear. Therefore, considering that a disruption in cholinergic neurotransmission has been related to the pathophysiology of brain damage in neurodegenerative diseases and in other inborn errors of the metabolism. **Methods:** In the present work we investigated the *in vivo* and *in vitro* effect of galactose on acetylcholinesterase (AChE) activity in different brain structures of developing rats. **Results:** It was observed that acute galactose administration did not alter AChE activity in cerebral cortex, hippocampus and striatum of suckling rats (15-day-old). On the other hand, when administered to older rats, galactose provoked a significant increase in AChE activity in cerebral cortex. Finally, it was observed that high dosis of galactose (5 mM and higher) *in vitro* also provoked an increase in this enzyme activity in cerebral cortex of 30-day-old rats. **Conclusion:** Our data demonstrate that acute galactose administration provokes an age-dependent increase in AChE activity in cerebral cortex of rats. It may be therefore concluded that a disruption in cholinergic homeostasis may be involved in the pathophysiology of brain damage observed in patients affected by Galactosemia.

**Keywords:** galactose; Galactosemia; acetylcholinesterase; brain

## Introduction

Deficiencies on the catabolic pathway of galactose leads to a group of inborn errors of metabolism known as Galactosemia, with an estimated prevalence ranging from 1:20.000 to 1:60.000 neonates<sup>1;2;3</sup>. Galactosemia (OMIM 230400) is characterized by galactose accumulation in tissues and biological fluids of affected patients and may be secondary to a deficiency of one of the three major enzymes involved in the galactose catabolism – galactokinase (GALK; Galactosemia type I), galactose-1-phosphate uridylyltransferase (GALT; Galactosemia type II), and uridine-diphosphate-galactose 4 epimerase (GALE; Galactosemia type III)<sup>3,4</sup>. The most common clinical phenotype of this disease is classic Galactosemia, which occurs due to impairment on GALT activity. Biochemically, patients affected by classic Galactosemia also present increased tissue concentrations of galactose-1-phosphate and its metabolites, galactitol and galactonate<sup>5</sup>. The treatment of Galactosemia is currently based on a galactose-free diet<sup>4</sup>.

This disease is clinically characterized by cataract and kidney failure, as well as ataxia and neurodevelopmental delay<sup>6</sup>. Despite the marked symptoms, the pathophysiology of tissue damage, particularly in brain, are virtually unknown. After decades of study of the pathophysiology of Galactosemia, many questions remain unknown regarding the toxicity of galactose and its metabolites<sup>6</sup>. Therefore, the purpose of this study is to evaluate the effect of high levels of galactose on the activity of acetylcholinesterase, an important enzyme implicated in cognitive functions and involved in the pathophysiology of brain damage in other common neurodegenerative disorders and inborn errors of the metabolism<sup>8;9;10</sup>, in brain of rats.

## Material and Methods

### 2.1. Reagents

All chemicals were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Gal was dissolved on the day of the experiments in the incubation medium with pH adjusted to 7.4.

### 2.2. Animals

Fifteen-, Thirty- and sixty-day-old male Wistar rats obtained from the Central Animal House of Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, SC – Brazil, were used. The animals were maintained on a 12:12 h light / dark cycle (lights on 07.00 - 19.00 h) in air conditioned constant temperature ( $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) colony room, with free access to water and 20% (w/w) protein commercial chow. The experimental protocol was approved by the Ethics Committee for Animal Research of the Universidade do Extremo Sul Catarinense (protocol 72/2010) and followed the “Principles of Laboratory Animal Care” (NIH publication 85-23, revised 1996). All efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering.

### 2.3. In vivo Experiments

The animals were divided into two groups: control group, which received a single injection of saline solution (0.9 g%), and galactose group, which received a single subcutaneous injection of D-galactose (5  $\mu\text{mol/g}$  body weight). One hour after the administration, the animals were killed by decapitation without anaesthesia, and the brains were rapidly excised on a

Petri dish placed on ice. The cerebral cortex, striatum and hippocampus were peeled away from the white matter. Immediately after, the brain structures were kept at  $-70^{\circ}\text{C}$  until being used for enzyme activity determination.

#### 2.4. In vitro Experiments

On the day of the experiments the animals were killed by decapitation without anesthesia and the cerebral cortex was rapidly excised on a Petri dish placed on ice. The brain structures were homogenized in a 100 mM phosphate buffer containing 0.1% Triton X-100, pH 7.5. The homogenates were centrifuged at  $800 \times g$  for 10 min at  $4^{\circ}\text{C}$ . The supernatants were isolated and were preincubated for 1 h at  $37^{\circ}\text{C}$  in the absence (control group) or presence of different concentrations of galactose (0,1- 0,5 – 1 - 5 - 10 mM).

We always carried out parallel experiments with various blanks (controls) in the presence or absence of galactose and also with or without supernatants in order to detect artefacts caused by this sugar in the assay. By doing so, any interference of galactose on the reactions used to measure AChE activity would be identified.

#### 2.5. Determination of AChE Activity

AChE activity was determined by the method of Ellman et al. (1961)<sup>11</sup>. Acetylcholine hydrolysis rate was measured in an incubation medium containing 0.8 mM acetylthiocholine, 100 mM phosphate buffer (pH 7.5) and 1.0 mM 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB). Fifty microliters of supernatants were added to the reaction mixture and preincubated for 3 min at



25°C. The hydrolysis was monitored by the formation of the thiolate dianion of DTNB at 412 nm for 2–3 min (30 s intervals) at 25°C. The results were expressed as  $\mu\text{mol}$  of hydrolysed acetylcholine  $\cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg}$  of protein<sup>-1</sup> and all samples were run in duplicate.

## 2.6. Protein determination

Protein was measured by the method of Lowry and colleagues (1951)<sup>12</sup>, using bovine serum albumin as standard.

## 2.7. Statistical analysis

Results are presented as mean  $\pm$  standard error of mean. Assays were performed in duplicate and the mean was used for statistical analysis. Data were analyzed using Student *t* test for independent samples (*in vivo* experiments) or one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the post-hoc Duncan multiple range test when *F* was significant (*in vitro* experiments). Differences between groups were rated significant at  $P \leq 0.05$ . All analyses were carried out in an IBM-compatible PC computer using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) software 16.0.

## Results

We first investigated the effect of acute galactose administration on AChE activity in various brain structures of infant rats (15-day-old) (Table 1). AchE activity was not altered by this treatment in any of the brain structures studied (cerebral cortex, striatum or hippocampus).

We then extended our investigation to the influence of acute galactose administration on AChE activity in cerebral cortex of older rats (30- and 60-day-old rats) (Figure 1). It was observed that AChE activity was significantly increased in the rats of both ages receiving galactose, as compared to control group.

Our final step was to investigate the *in vitro* effect of increasing concentrations of galactose on AChE activity in cerebral cortex of 30-day-old rats (Figure 2). It was observed that high galactose concentrations (5 and 10 mM) in the incubation medium provoked a significant increase on the activity of this enzyme. No differences were observed when lower galactose concentrations were added to the enzyme assay.

## **Discussion**

Increased galactose concentrations are the hallmark of Galactosemia, a group of diseases characterized by an inability to metabolize this sugar correctly. Clinical onset occurs in the neonatal period with unspecific signs including vomiting, diarrhea and weight loss. Despite the defective enzyme, neurological symptoms arise as the main clinical features observed in patients affected by Galactosemia, including lethargy, hypotonia, mental retardation, ataxia, dyspraxia and developmental delay<sup>4,5</sup>. Furthermore, jaundice, hepatomegaly, liver failure, renal tubular disease, hematologic abnormalities and septicemia have also been described in these patients<sup>3</sup>.

Currently, the pathophysiology of tissue dysfunction underlying the marked clinical symptoms in Galactosemia-affected patients, particularly the brain alterations, is still unclear. In this scenario, it has been proposed that

accumulating metabolites in these patients may be toxic, probably by inducing oxidative stress, and interfering on  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase,  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase and acetylcholinesterase activities<sup>13</sup>. Interestingly, chronic galactose administration was also shown to provoke a progressive deterioration in learning and memory capacity, being suitable as an animal model of aging<sup>14</sup>. However, it cannot be ruled out that alteration on important metabolic pathways, including decreased biosynthesis of glycoproteins and glycolipids and on inositol metabolism may also play a role in the pathophysiology of Galactosemia<sup>15;16</sup>.

Since the clinical onset of the neurological features in Galactosemia occurs during the first infancy, in the present work we initially investigated the influence of acute galactose administration on AchE activity in various brain structures of infant rats (15-day-old), without any significant alterations observed. In the next set of experiments, we observed that AchE activity was increased in cerebral cortex of rats with 30 and 60 days of life receiving galactose administration acutely. These data point to an age-dependent effect elicited by acute galactose administration enhancing AchE activity in the brain.

It has been demonstrated that brain development involves alteration of the cholinergic system<sup>17</sup>. In this context, signaling molecules may act by interfering on transcription and translation through a mechanism of feedback loop<sup>18;19</sup>, modulating the levels of proteins, enzyme products, or other molecules related to the action of the protein encoded by the gene considered<sup>20</sup>. Therefore, the increase of AchE activity may result from interactions between genetic and metabolic networks. Furthermore, since galactose (5 mM and higher) also provoked an increase of AchE activity *in vitro*, a direct effect elicited by galactose enhancing AchE activity cannot be ruled out. An alternative

explanation for the lack of galactose-induced stimulation of AchE in suckling rats (15 day-old) relies on the fact that infant rats are able to metabolize galactose approximately threefold faster than adult rats, therefore lowering galactose concentrations in the different brain structures<sup>21</sup>.

Nevertheless, the influence of galactose and its metabolites on AchE activity is still under debate. Previous reports showed that AchE activity was decreased in erythrocyte membrane of patients affected by Galactosemia, regardless of galactose and galactose-1-P concentrations in peripheral blood<sup>13</sup>. The same group reported *in vitro* that increased galactose-1-P, but not galactose inhibits AchE<sup>13</sup>. In addition, rats chronically administered with galactose showed decreased AChE activity and M-cholinergic receptor binding sites in cerebral cortex<sup>22</sup>. We believe that the different data obtained in our study and those carried out by other groups may be related to the different experimental conditions employed, including stage of development of the animals, tissue preparation and medium composition.

At the present, we cannot ascertain the exact pathophysiological relevance of our findings. However, it should be mentioned that the findings observed in the present work occurred at concentrations similar to those found in serum and tissues of patients affected by Galactosemia (up to 6.5 mM)<sup>23</sup>. Moreover, it has been previously demonstrated that some metabolites which accumulate in other inborn errors of the metabolism with neurological involvement are also able to interfere on AchE activity<sup>8;9;10</sup>.

Taken together, the present study provides evidence that galactose administration increases AchE activity in an age-dependent manner in cerebral cortex of rats. Considering that increased AchE activity has been related to

progressive neurological decline<sup>24:25</sup>, it is presumed that a disruption in the cholinergic system may be involved in the pathophysiology of the neurological symptoms observed in patients affected by Galactosemia.

### **Acknowledgement**

This was funded with grants from CNPq and UNESC.

## References

- 1) Holton J, Walter J, Tyfield L. Galactosemia. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Childs B, Kinzler KW, et al., editors. The metabolic and molecular bases of inherited disease. 8th Ed. New York: McGraw-Hill; 2001. p. 1553-87
- 2) 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.
- 3) Camello Jr S, 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. *Journal Inherited Metabolic Disease*, 2009.
- 4) Bosch AM . Classical galactosaemia revisited . *Metabolic dissertation* . *Journal Inherited Metabolic Disease* 29: 516-525, 2006.
- 5) Wierenga KJ, Lai K, Buchwald P, Tang M . High-Throughput Screening for Human Galactokinase Inhibitors. *Journal Biomolecular Screen* 13:415-423, 2008.

- 6) Lai K, Elsas LJ, Wiereng KJ. Galactose Toxicity in Animals. *IUBMB Life* 61: 1063-1074, 2009.
  
- 7) Mumma JO, Chhay JS, Ross KL, Eaton JS, Newell-Litwa KA, Fridovich-Keil JL. Distinct Roles of Galactose- 1P in Galactose Mediated Growth Arrest of Yeast Deficient in Galactose- 1P Uridyltransferase (GALT) and UDP-Galactose 4'- Epimerase (GALE). *Molecular Genetics Metabolism* 93: 160-171, 2008.
  
- 8) Zugno AI, Pereira LO, Mattos C, Scherer EBS, Netto C.A., Wyse ATS . Guanadinoacetato administration increases acetylcholinesterase activity in striatum of rats and impairs retention of an inhibitory avoidance task. *Metabolic Brain Disease* 23: 189-198, 2008.
  
- 9) Ratnakumari L, Qureshi IA, Maysinger D, Butterworth RF. Developmental deficiency of the cholinergic system in congenitally hyperammonemic mice: effect of acetyl-L-carnitine. *Journal Pharmacology Experimental Therapy* 274: 437-443, 1995.
  
- 10) Schulpis KH, Kalimeris K, Bakogiannis C, Tsakiris T, Tsakiris S. The effect of in vitro homocystinuria on the suckling rat hippocampal Acetylcholinesterase. *Metabolic Brain Disease* 21: 21-28, 2006.

- 11) Ellman GL, Courtney KD, Andres V Jr, Feather-Stone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemistry Pharmacology* 7: 88-95, 1961.
- 12) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal Biology Chemistry* 193: 265-275, 1951.
- 13) Tsakiris S, Michelakakis H, Schulpis K.H. Erythrocyte membrane acetylcholinesterase Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> - ATPase and Mg<sup>2+</sup> - ATPase activities in patients with classical galactosaemia. *Acta Paediatrica* 94: 1223-1226, 2005.
- 14) Lei M, Hua X, Xiao M, Ding J, Han Q, Hu G. Impairments of astrocytes are involved in the d-galactose-induced brain aging. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 369: 1082-1087, 2008.
- 15) Holden HM, Rayment I, Thoden JB. Structure and Function of Enzymes of the Leiloir Pathway for Galactose Metabolism. *Journal Biology Chemistry* 278: 43885-43888, 2003.
- 16) Lai K, Tang M, Yin X, Klapper H, Wiierenga K, Elsas LJ. ARHI: A new target of galactose toxicity in Classic Galactosemia. *Bioscience Hypotheses* 1: 263-261, 2008.



- 17) Herlenius E, Lagercrantz H. Development of neurotransmitter systems during critical periods. *Experimental Neurology* 190: S8–S21, 2004.
  
- 18) Salgado H, Santos-Zavaleta A, Gama-Castro S, Millan-Zarate D, Diaz-Peredo E, Sanchez-Solano F, Perez-Rueda E, Bonavides-Martinez C, Collado-Vides J, Regulon DB. RegulonDB (version 3.2): transcriptional regulation and operon organization in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Research* 29: 72–74, 2001.
  
- 19) Keseler IM, Collado-Vides J, Gama-Castro S, Ingraham J, Paley S, Paulsen IT, Peralta-Gil M, Karp PD. EcoCyc: a comprehensive database resource for *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research* 1: 334–337, 2005.
  
- 20) Khishna S, Andersson AM, Semsey S, Sneppen K. Structure and function of negative feedback loops at the interface of genetic and metabolic networks. *Nucleic Acids Research* 34: 2455–2462, 2006.
  
- 21) Cuatrecasas P, Segal S. Mammalian Galactokinase: developmental and adaptive characteristics in the rat liver. *The Journal of Biological Chemistry* 240, 1965.

- 22) Xiao F, Li XG, Zhang XY, Hou JD, Lin LF, Gao Q, Luo HM. Combined administration of D-galactose and aluminium induces Alzheimer-like lesions in brain. *Neuroscience Bulletin* 27: 143-155, 2011.
- 23) Tsakiris S, Schulpis KH. The effect of galactose metabolic disorders on rat brain acetylcholinesterase activity. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 55: 852-855, 2000.
- 24) Beerl R, Andres C, Iev-Lehman E, Timberg R, Huberman T, Shani M, Soreq H. Transgenic expression of human acetylcholinesterase induces progressive cognitive deterioration in mice. *Current biology* 5: 1063-1071, 1995.
- 25) García-Ayllón MS, Cauli O, Silveyra MX, Rodrigo R, Candela A, Campañ A, Jover R, Pérez-Mateo M, Martínez S, Felipo V, Sáez-Valero J. Brain cholinergic impairment in liver failure. *Brain* 131: 2946-2956, 2008.

## Legends to Figures

**Figure 1.** Effect of acute D-galactose (Gal; 5  $\mu\text{mol/g}$ ) administration on acetylcholinesterase activity in cerebral cortex from 30-day-old rats (black bars) and 60-day-old rats (white bars). Values are means  $\pm$  standard error of mean for six independent experiments performed in duplicate and are expressed as  $\mu\text{mol acetylcholine} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg protein}^{-1}$ .  $***P < 0.001$  compared to control group (Duncan multiple range test).

**Figure 2.** *In vitro* effect of D-galactose (Gal) on acetylcholinesterase activity in cerebral cortex from 30-day-old rats. Values are means  $\pm$  standard error of mean for six independent experiments performed in duplicate and are expressed as  $\mu\text{mol acetylcholine} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg protein}^{-1}$ .  $***P < 0.001$  compared to control group (Duncan multiple range test).

Figure 1.

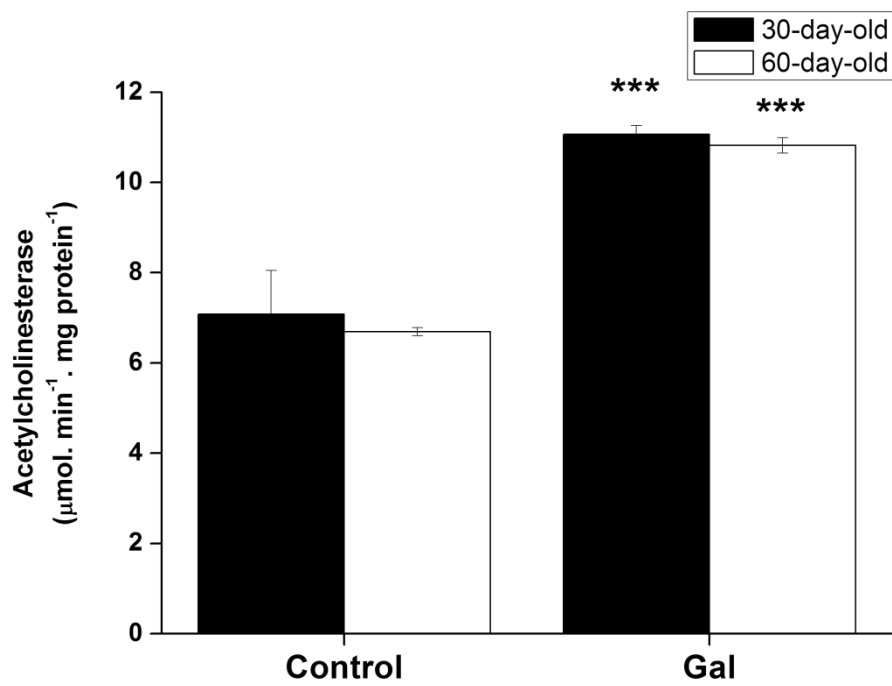
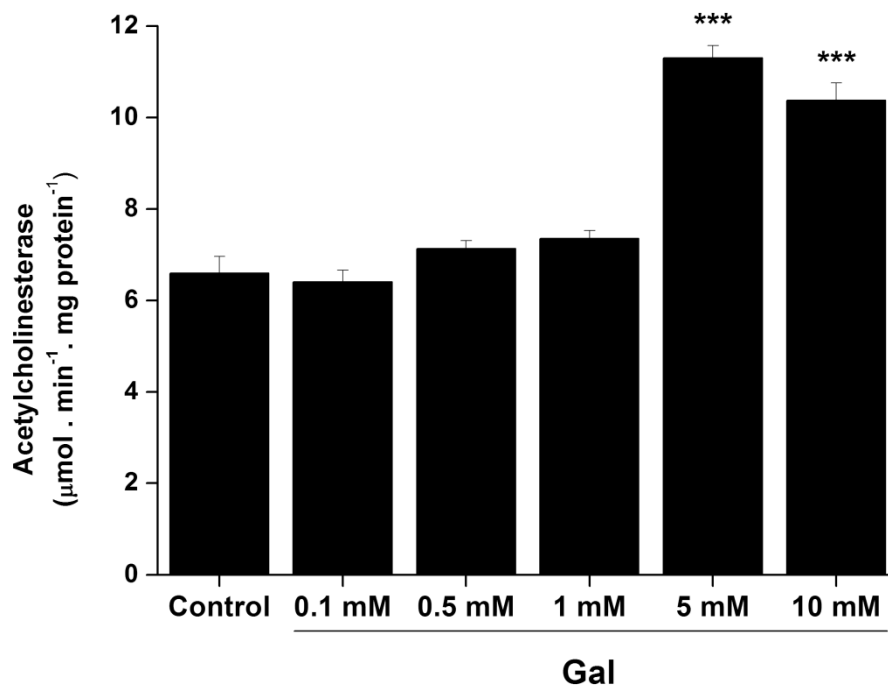


Figure 2.



**Table I** – Effect of acute D-galactose (Gal; 5  $\mu\text{mol/g}$ ) administration on acetylcholinesterase activity in brain structures from 15-day-old rats.

<b>Group</b>	<b>Cerebral Cortex</b>	<b>Striatum</b>	<b>Hippocampus</b>
Control	7.69 $\pm$ 1.03	6.94 $\pm$ 0.97	7.45 $\pm$ 0.87
Gal	9.23 $\pm$ 1.08	7.44 $\pm$ 0.92	7.43 $\pm$ 1.06

Values are mean  $\pm$  standard error of mean for six independent animals per group. Data were expressed as  $\mu\text{mol acetylcholine} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg protein}^{-1}$ . No significant differences were detected between groups (Student *t* test for independent samples).

**PARTE III**

### 3. DISCUSSÃO

Concentrações elevadas de Gal e seus metabólitos relacionados são encontradas em todos os tipos de Galactosemia, sendo este aumento variável conforme o tipo de Galactosemia. Na Galactosemia clássica (tipo II), por deficiência de GALT, e na Galactosemia tipo III, por deficiência de GALE, é observado principalmente aumento de Gal-1-P. Já na Galactosemia tipo I (deficiência de GALK), ocorre também o aumento de outros metabólitos, como galactitol e galactonato (Lai et al., 2008; Lai et al, 2009). As apresentações clínicas da doença variam conforme a enzima defeituosa, assim como a presença de seus metabólitos, sendo a Galactosemia tipo II a forma mais comum e clinicamente mais grave (Mumma et al, 2008). Alterações em decorrência da exposição prolongada a altas concentrações de Gal têm sido descritas em pacientes portadores da doença, incluindo diminuição cognitiva mostrada em testes de quociente de inteligência (QI), assim como déficit de memória, atraso no desenvolvimento ou alteração de fala e atraso de desenvolvimento global (tônica, postural, marcha) (Kaufman et al., 1995).

A administração de Gal em concentrações elevadas foi recentemente descrita como um modelo animal de doença neurodegenerativa (por exemplo, Doença de Alzheimer), devido à semelhança dos achados clínicos referentes ao SNC (Hua et al., 2008; Lei et al, 2008). As alterações neurológicas *in vivo* encontradas após a administração crônica de Gal subcutânea evidenciou alterações comportamentais (memória e aprendizado) neste modelo, similares às encontradas na doença de Alzheimer (Lu et al., 2010).



Em relação aos mecanismos que levam a estas alterações comportamentais, foi demonstrado que a administração crônica de Gal provoca alterações na atividade da AchE (Zhang et al., 2004; Lu et al., 2010). Além dos achados na neurotransmissão colinérgica, foi evidenciada também a alterações na regulação antioxidante *in vivo*, mostrando diminuição da atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e da glutathione peroxidase, e resultando no decréscimo das defesas antioxidantes em detrimento das espécies reativas (Zhang et al., 2004). Este indicativo de alteração do equilíbrio oxidativo também gerou a possibilidade da utilização de compostos antioxidantes para o reestabelecimento do equilíbrio entre defesas e espécies reativas. Neste sentido, foi demonstrado que compostos antioxidantes como o resveratrol e a tetrametilpirazina podem reverter o dano oxidativo, levando a uma melhora dos processos de aprendizado e memória de ratos (Zhang et al., 2004; Lu et al., 2006). Diminuição da atividade dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial foi observada em córtex cerebral e hipocampo de camundongos administrados cronicamente com Gal por um período de seis semanas, acompanhada por um aumento de espécies reativas de oxigênio e da atividade da óxido nítrico sintetase (Zhang et al. 2010).

Considerando que as alterações neurológicas observadas em pacientes afetados pela Galactosemia podem se iniciar no período neonatal, no presente trabalho inicialmente se investigou a influência da administração aguda Gal na atividade da AchE em diferentes estruturas cerebrais de ratos lactente (15 dias de vida), sem qualquer alteração significativa observada. Posteriormente foi observado que a atividade da AchE aumentou no córtex cerebral de ratos com 30 e 60 dias que receberam administração aguda de gal. Estes dados apontam

para um efeito idade-dependente provocado pela administração aguda de Gal levando a um aumento na atividade da AchE.

Há estudos demonstrando que o desenvolvimento do cérebro envolve alterações do sistema colinérgico (Herlenius e Lagercrantz, 2004). Neste contexto, moléculas de sinalização podem agir interferindo nos processos de transcrição e tradução através de um mecanismo de retroalimentação (Salgado et al, 2001; Keseler et al, 2005), modulando os níveis de proteínas, produção de enzima, moléculas relacionadas com a ação da proteína codificada pelo gene considerado (Khishna et al., 2006). Portanto o aumento da atividade da AchE pode resultar de interações genéticas e metabólicas. Além disso, como a Gal (em concentrações de 5 mM ou superiores) também provocou um aumento da atividade da AchE *in vitro*, não podemos descartar que o aumento *in vivo* da AchE em cérebro de animais que receberam Gal ocorra em decorrência de um efeito direto deste carboidrato. Uma possível explicação para o fato de não ter ocorrido alteração nos níveis de AchE em ratos com 15 dias de vida baseia-se no fato de que, nesta idade, os animais são capazes de metabolizar a Gal três vezes mais rápido que ratos mais velhos (30-60 dias de vida), diminuindo, assim, a concentração de Gal nas diferentes estruturas cerebrais (Cuatrecasas & Segal, 1965). Entretanto, o efeito da Gal e de seus metabólitos sobre a atividade da AchE ainda está sob debate. Tsakiris e colaboradores (2000) utilizaram uma mistura de galactitol e Gal-1-P (2 mM cada) em homogeneizados de cérebros de ratos e observaram um aumento da atividade da AchE. No entanto, quando foram utilizadas concentrações mais elevadas destes copostos, foi encontrada uma inibição na atividade catalítica desta enzima. Além disso, Marinou e colaboradores demonstraram uma diminuição *in*

*vitro* da atividade da AchE em córtex cerebral, hipocampo e hipotálamo de ratos na presença de gal, Gal-1-P e galactonato, mas não na presença de galactitol. Achados similares foram observados quando foi utilizado um mix de substâncias que mimetizam as diferentes formas clínicas da doença, deficiência da GALT (Gal, galactitol e Gal-1-P) e deficiência da GALK (Gal e galactitol). Baseado nos resultados obtidos no nosso trabalho e nos trabalhos acima mencionados, acreditamos que as diferenças encontradas possam estar relacionadas as diferentes condições experimentais utilizadas, incluindo estágio de desenvolvimento dos animais, preparação de tecidos e composição do meio.

No presente momento, não podemos determinar a exata relevância fisiopatológica dos nossos achados. Em relação às concentrações utilizadas no presente estudo, sabe-se que em pacientes com Galactosemia, as concentrações séricas de Gal são variáveis conforme a aderência ao tratamento restritivo dietético. Um estudo europeu com quarenta e um pacientes afetados por Galactosemia demonstrou que os níveis plasmáticos de Gal ficou em  $3,8 \pm 1,7 \mu\text{mol/L}$ , quando comparados ao grupo controle constituído de trinta e três indivíduos ( $0,33 \pm 0,06 \mu\text{mol/L}$ ) (Schadewaldt et al., 2004). Em um estudo similar realizado nos Estados Unidos foram analisadas as concentrações de Gal no plasma de quinze pacientes com tratamento dietético adequado, encontrando concentração Gal de  $2,72 \pm 0,7 \mu\text{mol/L}$  (indivíduos controles saudáveis:  $1,48 \pm 0,7 \mu\text{mol/L}$ ) (Ning et al., 2000). Por último, foi demonstrado que antes de realizar tratamento, neonatos com Galactosemia clássica apresentam concentrações de Gal-1-P elevadas em hemolisados de até 6,5 mM e, após a instituição do tratamento com restrição

da ingesta de gal, os níveis caem drasticamente chegando 0,1 a 0,2 mM em hemolisados. Cabe salientar que em indivíduos saudáveis, os níveis de galactose-1- fosfato são indetectáveis quando são utilizados os mesmos métodos de detecção (Gitzelmann, 1995). Dessa forma, deve-se mencionar que os resultados encontrados no presente trabalho ocorreram utilizando-se concentrações semelhantes aquelas encontradas no soro e tecidos de pacientes afetados por Galactosemia.

Nosso estudo fornece evidências que a administração aguda de Gal aumenta a atividade da AchE em córtex cerebral de ratos em forma idade-dependente. Considerando que a atividade aumentada da AchE pode estar relacionada a um progressivo dano neurológico (Beeri et al 1995; García-Ayllón et al, 2008), podemos presumir que um desequilíbrio do sistema colinérgico pode estar envolvido na fisiopatologia das alterações neurológicas observadas em pacientes afetados por Galactosemia. No entanto, diversos mecanismos ainda devem ser melhor investigados antes de se propor uma terapia com moduladores da neurotransmissão colinérgica para estes pacientes, incluindo a investigação dos efeitos da Gal sobre os mecanismos envolvidos no controle dos níveis de acetilcolina na fenda sináptica (síntese, liberação, degradação e recaptação deste neurotransmissor), bem como sobre a quantidade, distribuição e funcionalidade dos diferentes tipos de receptores colinérgicos.

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANGLADE P; LARABI-GODINOT Y. Historical landmarks in the histochemistry of the cholinergic synapse perspectives for future researches. **Biomedical research** 31(1): 1-12, 2010.

BEERI R; ANDRES C; LEV-LEHMAN E; TIMBERG R; HUBERMAN T; SHANI M; SOREQ H . Transgenic expression of human acetylcholinesterase induces progressive cognitive deterioration in mice. **Current biology** 5: 1063-1071, 1995.

BERHMAN RE; KLIEGMAM RM; JENSON HB. **Nelson, tratado de pediatria** 17 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, pp 425 –552 . 2005

BOSCH AM; GROOTHENHUIS MA; BAKKER HD; HEIJMANS HAS; WIJIBURG FA; LAST BF. Living With Classical Galactosemia: Health-Related Quality of Life Consequences. **Pediatrics** 113: 423-428, 2004.

BOSCH AM. Classical galactosaemia revisited . Metabolic dissertation . **Journal Inherited Metabolic Disease** 29: 516-525, 2006.

BURANT CF, TAKEDA J, BROU-LAROCHE E, BELL GI, DAVIDSON NO.

Fructose transporter in human spermatozoa and small intestine is GLUT5.

**Journal Biology Chemistry**; 267: 14523-14526, 1992.

CAMELLO JR S; 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. **Journal Inherited**

**Metabolic Disease**, 2009.*in press*

CUATRECASAS P; SEGAL S. Mammalian Galactokinase: developmental and

adaptive characteristics in the rat liver. **The Journal of Biological**

**Chemistry**, 240 (6) 1965.

CUI X; ZUO P; ZHANG Q; LI X; HU Y; LONG J; PACKER L; LIU J. Chronic

systemic D-galactose exposure induces memory loss, neurodegeneration,

and oxidative damage in mice: protective effects of R-alpha-lipoic acid.

**Journal Neuroscience Research** 84(3):647-54, 2006.

DAVIDSSON P; BLENNOW K; ANDREASEN N; ERIKSSON B; MINTHON L;

HESSE C. Differential increase in cerebrospinal fluid-acetylcholinesterase

after treatment with acetylcholinesterase inhibitors in patients with

Alzheimer's disease. **Neuroscience Letters** 300: 157-160, 2001.

DOYLE CM ; CHANNON S ; ORLOWSKA D ; LEE PJ . The neuropsychological profile of galactosaemia . **Journal Inherited Metabolic Disease** DOI 10.1007/s10545-010-9154-y, 2010.

ELSAS LJ. Galactosemia. In: Pagon RA, Bird TC, Dolan CR, Stephens K, editors. **GeneReviews** , 2011.

GARCÍA-AYLLÓN MS; CAULI O; SILVEYRA MX; RODRIGO R; CANDELA A; CAMPAÑ A; JOVER R; PÉREZ-MATEO M; MARTÍNEZ S; FELIPO V; SÁEZ- VALERO J. Brain cholinergic impairment in liver failure. **Brain** 131: 2946-2956, 2008.

FRIEDMAN JH; LEVY HL; BOUSTANY RM. Late onset of distinct neurologic syndromes in galactosemic siblings. **Neurology** 39:741–742, 1989.

GITZELMANN R. Galactose 1- phosphate in the pathophysiology of Galactosemia. **Europe Journal Pediatrics** 154: S45, 1995.

GOODMAN LS; GILMAN A. **Goodman & Gilman. As bases farmacológicas da terapêutica**. 11 ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill pp 89- 146, 2006.

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

HEDIGER MA, COADY MJ, IKEDA TS, WRIGHT EM. Expression cloning and cDNA sequencing of the Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter. **Nature**; 330: 379-381,1987.

HERLENIUS E; LAGERCRANTZ H. Development of neurotransmitter systems during critical periods. **Experimental Neurology**. 190 (1), S8–S21, 2004

HOLDEN HM; RAYMENT I; THODEN JB. Structure and Function of Enzymes of the Leiloir Pathway for Galactose Metabolism. **Journal Biology Chemistry** 278:43885-43888, 2003.

HOLTON J; WALTER J; TYFIELD L. Galactosemia. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Childs B, Kinzler KW, et al., editors. **The metabolic and molecular bases of inherited disease**. 8th Ed. New York: McGraw-Hill; 2001. p. 1553-87

HUA X; LEI M; DING J; HAN Q; HU G; XIAO M. Pathological and biochemical alterations of astrocytes in ovariectomized rats injected with D-galactose: a potential contribution to Alzheimer's disease processes. **Experimental Neurology** 210(2):709-18;, 2008.



KAUFMAM FR; MCBRIDE-CHANG C; MANIS FR; WOLFF JA; NELSON MD.

Cognitive functioning neurologic status and brain imaging in classical Galactosemia. **Europe Journal Pediatrics** (suppl 2 ) 154: S2-S5, 1995.

KELLETT GL, BROT-LAROCHE E. Apical GLUT2: a major pathway of intestinal sugar absorption. **Diabetes** 54: 3056–3062 , 2005.

KELLETT GL, HELLIWELL PA. The diffusive component of intestinal glucose absorption is mediated by the glucose-induced recruitment of GLUT2 to the brush-border membrane. **Biochemical Journal** 350 Pt 1: 155–162, 2000.

KESELER IM; COLLADO-VIDES J; GAMA-CASTRO S; INGRAHAM J; PALEY S; PAULSEN IT; PERALTA-GIL M; KARP PD. EcoCyc: a comprehensive database resource for Escherichia coli. **Nucleic Acids Research** 1, 334–337, 2005

KHISHNA S; ANDERSSON AM; SEMSEY S; SNEPPEN K. Structure and function of negative feedback loops at the interface of genetic and metabolic networks. **Nucleic Acids Research**. 34, 2455–2462, 2006.

LAI K; LANGLEY SD; KHWAJA FW; SCHIMITT EW; ELSAS LJ. GALT deficiency causes UDP-hexose deficit in human galactosemic cells. **Glycobiology** 4(13): 285-294, 2003.

LAI K; TANG M; YIN X; KLAPPER H; WIIERENGA K; ELSAS LJ. ARHI: A new target of galactose toxicity in Classic Galactosemia. **Bioscience Hypotheses** 1:263-261, 2008.

LAI K; ELSAS LJ; WIERENG KJ. Galactose Toxicity in Animals. **IUBMB Life** 61: 1063-1074, 2009.

LAW A; GAUTHIER S; QUIRION R. Say NO Alzheimer's disease: The putative links between nitric oxide and dementia of the Alzheimer's type. **Brain Research** 35: 73-96, 2001.

LEI M; HUA X; XIAO M; DING J; HAN Q; HU G. Impairments of astrocytes are involved in the d-galactose-induced brain aging. **Biochemistry Biophysics Research Communitts** 369(4):1082-7, 2008.

LU J; WU DM; HU B; CHENG W; ZHENG YL; ZHANG ZF; YE Q; FAN SH; SHAN Q; WANG YJ. Chronic administration of troxerutin protects mouse brain against D-galactose-induced impairment of cholinergic system. **Neurobiology Learning Memory** 93(2):157-64, Feb, 2010.

LUO L; HUANG YM. Effect of resveratrol on the cognitive ability of Alzheimeros mice. **Zhong Nan Da XueXueBao Yi Xue Ban** 31(4):566-9, 2006.

MARINO K; TSAKIRIS S; TSOPANAKIS C; SCHULPIS KH; BEHRAKIS P.

Suckling Rat Brain Regional Distribution of Acetylcholinesterase Activity in Galactosaemia In Vitro. **Metabolic Brain Disease** 3 (20):227-36, 2005.

MÜLLER TC; ROCHA JBT; MORSCH VM; NEIS RT; SCHETING MRC.

Antidepressants inhibit human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activity. **Biochimica et Biophysica Acta** 1587: 82-98, 2002.

MUMMA JO; CHHAY JS; ROSS KL; EATON JS; NEWELL-LITWA KA

FRIDOVICH-KEIL JL. Distinct Roles of Galactose- 1P in Galactose Mediated Growth Arrest of Yeast Deficient in Galactose- 1P Uridyltransferase (GALT) and UDP-Galactose 4'- Epimerase (GALE). **Molecular Genetics Metabolism** 93:160-171, 2008.

NING C; SEGAL S. Plasma galactose and galactitol concentration in patients with galactose 1-phosphate uridyltransferase deficiency Galactosemia determination by gas chromatography/mass spectrometry. **Metabolism** 49: 1460, 2000.

RATNAKUMARI L; QURESHI IA; MAYSINGER D; BUTTERWORTH RF.

Developmental deficiency of the cholinergic system in congenitally hyperammonemics of mice: effect of acetyl-L-carnitine. **Journal Pharmacology Experimental Therapy** 274(1):437-43, 1995.

SALGADO H; SANTOS-ZAVALA A; GAMA-CASTRO S; MILLAN-ZARATE D; DIAZ-PEREDO E; SANCHEZ-SOLANO F; PEREZ-RUEDA E; BONAVIDES-MARTINEZ C; COLLADO-VIDES J; REGULON DB. REGULONDB (VERSION 3.2). Transcriptional regulation and operon organization in Escherichia coli K-12. **Nucleic Acids Research** 29, 72–74, 2001

SCHADEWALDT P; KAMALANATHAN L; HAMMEN HW; WENDEL U. Stable-isotope dilution analysis of galactose metabolites in human erythrocytes. **Rapid Communications Mass Spectrometry** 17: 2833, 2003.

SCRIVER CR; BEAUDET AL; SLY WS; VALLE D. (Eds). **The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease**. 8<sup>a</sup> edition. New York, McGraw-Hill, pp. 3-45, 2001.

SHIN-BUEHRING YS; SCHAUB J. Pitfalls in the radioactive method of galactose-1-phosphate uridyltransferase activity measurement. *Clinical Chemistry Acta* 25;106(2):231-4, 1980.

SMITH CM; MARKS AD; LIEBERMAN MA. **Marks' Basic Medical Biochemistry: A Clinical Approach**, 2<sup>a</sup> ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2005.

STEFANELLO FM; ZUGNO AI; WANNAMACHER CMD; WAJNER M; WYSE  
ATS. Homocysteine inhibits butyrylcholinesterase activity in rat serum.

**Metabolic Brain Disease** 18 : 187-194, 2003.

SCHULPIS KH; KALIMERIS K; BAKOGIANNIS C; TSAKIRIS T; TSAKIRIS S.

The effect of in vitro homocystinuria on the suckling rat hippocampal  
Acetylcholinesterase. **Metabolism Brain Disease** 21(1):21-8, 2006.

TALESA VN. Acetylcholinesterase in Alzheimer's disease . **Mechanisms of**

**Ageing and Development** 122: 1961-1969, 2001.

THORENS B, SARKAR HK, KABACK HR, LODISH HF. Cloning and functional  
expression in bacteria of a novel glucose transporter present in liver,  
intestine, kidney, and beta-pancreatic islet cells. **Cell**; 55: 281-290,1988.

TSAKIRIS S; SCHULPIS KH. The effect of galactose metabolic disorders on rat  
brain acetylcholinesterase activity. **Zeitschrift für Naturforschung C** 55  
(9-10):852-5, 2000.

TSAKIRIS S; SCHULPIS KH; TJAMOURANIS J; MICHELAKAKIS H; KARIKAS  
GA. Reduced acetylcholinesterase activity in erythrocyte membranes from  
patients with phenylketonuria. **Clinical Biochemistry** 35(8):615-9, 2002.

TSAKIRIS S; MICHELAKAKIS H; SCHULPIS KH. Erythrocyte membrane acetylcholinesterase  $\text{Na}^+$  ,  $\text{K}^+$  - ATPase and  $\text{Mg}^{2+}$  - ATPase activities in patients with classical galactosaemia. **Acta Paediatrica** 94: 1223-1226, 2005.

VIEGAS JR C; BOLZANI VS; FURLAN M; FRAGA CAM; BARREIRO EJ. Natural products as candidates for useful drugs in the treatment of Alzheimer's disease. **Química Nova** vol.27 no.4, 2004

WIERENGA KJ; LAI K; BUCHWALD P; TANG M. High-Throughput Screening for Human Galactokinase Inhibitors. **Journal Biomolecular Screen** 13:415-423, 2008.

WOOLLEY DW; GOMMI BW. Serotonin receptors, IV. Specific deficiency of receptors in galactose poisoning and its possible relationship to the idiocy of Galactosemia. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** 52:14-19, 1964.

ZHANG C; WANG SZ; ZUO PP; CUI X; CAI J. Protective effect of tetramethylpyrazine on learning and memory function in D-galactose-lesioned mice. **Chinese Medical Science Journal** 19(3):180-4, Sep, 2004.

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. **Neurologic Research** 27:552–556, 2005a.

ZHANG X; LIU W; NIU X; AN L. Systemic administration of catalpol prevents D-galactose induced mitochondrial dysfunction in mice. **Neuroscience Letters** 473(3):224-8, 2010.

ZUGNO AI; PEREIRA LO; MATTOS C; SCHERER EBS; NETTO CA; WYSE ATS. Guanadinoacetato administration increases acetylcholinesterase activity in striatum of rats and impairs retention of an inhibitory avoidance task. **Metabolic Brain Disease** 23: 189-198, 2008.

XIAO F; LI XG; ZHANG XY; HOU JD; LIN LF; GAO Q; LUO HM. Combined administration of D-galactose and aluminium induces Alzheimer-like lesions in brain. **Neuroscience Bull** 27(3):143-55. Jun, 2011.