

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA**

**EFEITO DO GANGLIOSÍDEO GM1 SOBRE A  
ATIVIDADE DA CATALASE EM ESTRIADO,  
HIPOCAMPO E CÓRTEX CEREBRAL DE RATOS**

---

**ANA FLÁVIA FURIAN**

**Orientador: Prof. Dr. Carlos Fernando de Mello**

Porto Alegre, RS

2007

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA**

**EFEITO DO GANGLIOSÍDEO GM1 SOBRE A  
ATIVIDADE DA CATALASE EM ESTRIADO,  
HIPOCAMPO E CÓRTEX CEREBRAL DE RATOS**

---

**ANA FLÁVIA FURIAN**

**Orientador: Prof. Dr. Carlos Fernando de Mello**

Dissertação apresentada  
ao Curso de Pós-Graduação em  
Ciências Biológicas: Bioquímica, da  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
como requisito parcial à obtenção do  
grau de Mestre em Bioquímica

Porto Alegre, RS

2007

*“Maravilhar-se é o primeiro passo para o  
descobrimento”.*

*Louis Pasteur*

*Essa dissertação é dedicada aos meus pais,  
Maria Helena e Clóvis Furian,  
Que sempre me apoiaram!!*

## ***AGRADECIMENTOS***

Aos meus pais, Maria Helena e Clóvis, que nunca mediram esforços para que eu conseguisse alcançar os objetivos até hoje alcançados, por terem me dado às condições materiais e morais e por serem exemplo de dedicação e renovação. Se hoje sou uma pessoa realizada, devo isso a vocês;

Aos meus irmãos, Ana Paula e Eduardo, que nunca deixaram de torcer por mim, mesmo estando longe; pela alegria dos meus sobrinhos Pedro Henrique e Maria Eduarda e a minha cunhada Sandra;

Ao Mauro, que é muito mais que meu amor, meu amigo, colega, meu companheiro e incentivador, que me ensinou muito e que sempre esteve ao meu lado durante toda a realização deste trabalho, obrigada pelo amor, carinho, paciência, apoio e incentivo;

Ao Prof. Carlos Mello, por ter me concedido a oportunidade de trabalhar sob sua orientação, por sua ajuda, dedicação, confiança no meu trabalho e principalmente pela amizade e experiência. Pela confiança em ter deixado o laboratório sobre nossa responsabilidade por todo o período em que estive distante, e pelos inúmeros e-mails e bate-papos durante este período;

À minha equipe Mauro, Nando, Michele, Natália, e a Jociane, que me ajudaram na realização deste trabalho, foram amigos e parceiros em todos os momentos, pelos longos e consecutivos experimentos. Sem vocês não conseguiria realizar este trabalho. Muito obrigado;

À minha família que sempre, apesar de longe, acreditou e me deu força sempre;

Aos colegas do laboratório do 18 e do 21, principalmente o Gustavo, a Patrícia, a Gerusa, a Gabriela, o Juliano e a Fabi, o Aledson, as “gurias da pirexia”, pelo incentivo, amizade, confiança, atenção e principalmente pelos momentos de descontração no “bosque”, na casa do Carlos e no Juliano;

A professora Susana, ao professor Juliano, professor Rudi e ao professor João pela disponibilidade de materiais, tempo e conselhos, necessários para que eu chegasse até aqui;

A Marília, que compartilhou comigo várias alegrias, momentos de descontração, pelo incentivo e companheirismo;

Aos meus amigos, por serem meus amigos e incentivadores;

A todos aqueles que de alguma maneira contribuíram para a realização desse trabalho, pela sempre presente receptividade e acessibilidade, o meu muito obrigado!

A TRB Pharma pela doação do gangliosídeo GM1;

Aos animais, que deram suas vidas para o desenvolvimento deste trabalho;

Agradeço a Universidade Federal do Rio Grande do Sul pela oportunidade e ao CNPq, pelo apoio financeiro.

# SUMÁRIO

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Capítulo I .....</b>  | <b>1</b>  |
| <b>Resumo .....</b>  | <b>2</b>  |
| <b>Abstract .....</b>  | <b>3</b>  |
| <br>   |           |
| <b>Lista de Abreviaturas .....</b>   | <b>4</b>  |
| <br>   |           |
| <b>1. Introdução.....</b>  | <b>5</b>  |
| <br>   |           |
| <b>1.1. Gangliosídeos.....</b>   | <b>6</b>  |
| 1.1.1 Histórico.....   | 6         |
| 1.1.2 Estrutura Química e Nomenclatura .....   | 6         |
| 1.1.3 Localização .....  | 8         |
| 1.1.4 Funções dos Gangliosídeos .....  | 9         |
| <br>   |           |
| <b>1.2. Radicais Livres e Espécies Reativas.....</b>                                 | <b>17</b> |
| 1.2.1 Conceito e Formação dos Radicais Livres e Espécies Reativas .....              | 17        |
| 1.2.2 Radicais Livres e Sistema Nervoso Central.....                                 | 19        |
| 1.2.3 Sistemas de defesas antioxidantes contra as Espécies Reativas de Oxigênio..... | 21        |
| 1.2.4 Defesas Enzimáticas.....   | 22        |
| 1.2.4.1 Superóxido Dismutase .....   | 22        |
| 1.2.4.2 Glutathione Peroxidase.....  | 23        |
| 1.2.4.3 Catalase.....  | 25        |
| <br>   |           |
| <b>2. Objetivos.....</b>   | <b>28</b> |
| 2.1 Objetivo Geral .....   | 29        |
| 2.2 Objetivos Específicos .....  | 29        |

|                         |           |
|-------------------------|-----------|
| <b>Capítulo II.....</b> | <b>30</b> |
|-------------------------|-----------|

|                      |           |
|----------------------|-----------|
| <b>3.Artigo.....</b> | <b>31</b> |
|----------------------|-----------|

**Furian, A.F., Schneider, M.O., Royes, L.F.F., Fighera, M.R., Fiorenza, N.G., Myskiw, J.C., Weiblen, R., Rubin, M.A., Frussa-Filho, R., Mello, C.F. “Vasodilation Underlies the Increase of Catalase Activity Induced by GM1 Ganglioside in the Brain”.**

Submetido a Free Radical Biology & Medicine.

|                           |           |
|---------------------------|-----------|
| <b>Capítulo III .....</b> | <b>61</b> |
|---------------------------|-----------|

|                           |           |
|---------------------------|-----------|
| <b>4. Discussão .....</b> | <b>62</b> |
|---------------------------|-----------|

|                            |           |
|----------------------------|-----------|
| <b>5. Conclusões .....</b> | <b>70</b> |
|----------------------------|-----------|

|  |           |
|--|-----------|
| <b>6. Referências Bibliográficas .....</b> | <b>72</b> |
|--|-----------|

|                        |           |
|------------------------|-----------|
| <b>7. Anexos .....</b> | <b>88</b> |
|------------------------|-----------|

|                                      |    |
|--------------------------------------|----|
| 7.1 Lista de Figuras e Tabelas ..... | 89 |
|--------------------------------------|----|

|                              |    |
|------------------------------|----|
| 7.2 Dados não mostrados..... | 91 |
|------------------------------|----|

|  |    |
|--|----|
| 7.3 Trabalhos desenvolvidos no período não relacionados à Dissertação..... | 93 |
|--|----|

# **CAPÍTULO I**

## RESUMO

O monossialogangliosídeo (GM1) é um glicoesfingolípido presente na maioria das membranas celulares que possui propriedades antioxidantes e neuroprotetoras. O GM1 protege o sistema nervoso central de vários agentes ou condições neurotóxicas, como exposição ao ácido aspártico, MPTP, ácido glutâmico, metilmalônico e glutárico, anóxia e isquemia, doença de Parkinson e Alzheimer. Os mecanismos neuroquímicos envolvidos na neuroproteção induzida pelo GM1 não são completamente conhecidos, mas a variedade de situações em que ele tem efeito neuroprotetor sugere que o GM1 interage com uma via comum, envolvida no desenvolvimento de dano celular, como o estresse oxidativo.

A catalase (EC 1.11.1.6) é uma enzima antioxidante intracelular que catalisa a reação do peróxido de hidrogênio à água e oxigênio molecular, e é particularmente abundante nos eritrócitos, onde metaboliza cerca de 90% do peróxido de hidrogênio. Devido à sua baixa expressão no cérebro, ela tem sido considerada uma enzima secundária no controle dos radicais livres neste órgão. Contudo, alguns autores argumentam que, devido à sua baixa atividade ela seria um ponto de vulnerabilidade no metabolismo das espécies reativas no sistema nervoso central.

Neste estudo, investigamos o efeito do GM1 sobre a atividade da catalase *ex vivo* e *in vitro*. Além disso, avaliamos o efeito da remoção dos eritrócitos dos vasos sanguíneos cerebrais, sobre a atividade da catalase, com a finalidade de estimar a contribuição da catalase eritrocitária para o aumento da catalase cerebral induzida por GM1. Nós também avaliamos se o GM1 altera o conteúdo de hemoglobina nas amostras cerebrais e a espessura dos vasos sanguíneos cerebrais.

Os animais receberam duas injeções de GM1 (50 mg/kg, i.p.) ou salina (0.9 % NaCl, 1 ml/kg, i.p.), em 24 h. Trinta minutos após a segunda injeção, eles foram sacrificados por decapitação e seus cérebros foram removidos e usados nos ensaios bioquímicos. A atividade da catalase e o conteúdo de hemoglobina foram analisados no hipocampo, córtex e estriado de ratos.

A administração de GM1 aumentou a atividade da catalase e o conteúdo de hemoglobina nas amostras cerebrais, mas não teve efeito sobre a catalase sanguínea. Esses efeitos foram abolidos pela perfusão transcardíaca com solução salina heparinizada. Calculamos a atividade da catalase cerebral na ausência de eritrócitos por regressão linear, utilizando os dados dos animais perfundidos e não-perfundidos, e não foi observada alteração pelo tratamento com GM1. Além disso, a adição de GM1 (100 – 1000  $\mu$ M) não aumentou a atividade da catalase em fatias de córtex cerebral *in vitro*, sugerindo que a integridade do sistema vascular é requerida para o efeito facilitatório sobre a atividade da catalase pelo GM1. O efeito vasodilatador do GM1 foi confirmado *in vivo*, pois a injeção sistêmica de GM1 (50 mg/kg, i.p.) aumentou (1.5-2.5 vezes) a espessura dos vasos sanguíneos cerebrais de pequeno diâmetro.

Neste estudo, nós mostramos que a vasodilatação está envolvida no aumento da atividade da catalase cerebral induzida pelo GM1. Nós sugerimos que a atividade da catalase eritrocitária tem papel antioxidante no sistema nervoso central, e que uma terapia adjunta com GM1 é válida em condições clínicas onde o aumento do fluxo sanguíneo é associado a um melhor prognóstico, como doenças vasculares obstrutivas e doenças neurodegenerativas.

## ABSTRACT

Monosialoganglioside (GM1) is a glycosphingolipid present in most cell membranes that has antioxidant and neuroprotective properties. GM1 protects the central nervous system against various neurotoxic agents or conditions, such as aspartic acid, MPTP, glutamic acid, methylmalonic acid and glutaric acid exposure, anoxia and ischemia, Parkinson's and Alzheimer's diseases. The neurochemical mechanisms underlying GM1-induced neuroprotection are not completely known, but the wide range of situations in which GM1 is neuroprotective suggests that it may interact with common pathways involved in the development of cell injury, such as oxidative stress.

Catalase (EC 1.11.1.6) is an intracellular antioxidant enzyme that catalyzes the reaction of hydrogen peroxide to water and molecular oxygen, and is particularly enriched in erythrocytes, where it metabolizes 90% of the hydrogen peroxide. Due to its poor expression in the brain, catalase has been considered a secondary enzyme in controlling free radical-induced damage in this organ.

In the present study we evaluated the effect of GM1 on cerebral catalase activity *ex vivo* and *in vitro*. Moreover, the effect of erythrocyte removal on cerebral catalase activity of control and GM1-treated animals was also evaluated, in order to estimate the contribution of erythrocyte-derived catalase for the increase of catalase activity in the brain induced by the systemic injection of GM1. In addition, we investigated whether GM1 alters the content of hemoglobin in cerebral samples and the width of pial vessels of rats.

Animals received two injections of GM1 (50 mg/kg, i.p.) or saline (0.9 % NaCl, 1 ml/kg, i.p.), spaced 24 h apart. Thirty minutes after the second GM1 or saline injection, they were sacrificed by decapitation and their brains were rapidly removed and used for biochemical assays. Catalase activity and content of hemoglobin were analyzed in hippocampus, cortex and striatum and blood of rats.

GM1 administration increased catalase activity and hemoglobin content in brain samples, but had no effect on blood catalase activity. GM1-induced increase of catalase activity and the content of hemoglobin were abolished by transcardiac perfusion with heparinized ice-cold saline. Brain catalase activity in the absence of erythrocytes, estimated by regression analysis of data from perfused and non-perfused animals, was not altered by the systemic injection of GM1. Moreover, the addition of GM1 (100 – 1000  $\mu$ M) did not increase catalase activity in slices of cerebral cortex *in vitro*, further suggesting that an intact vascular system is required for the facilitatory effect of GM1 on brain catalase activity. The vasodilatory effect of GM1 was confirmed *in vivo*, since the systemic injection of GM1 (50 mg/kg, i.p.) increased (1.5-2.5 times) the width of pial vessels.

In summary, in this study we showed that vasodilation underlies the GM1-induced increase of catalase activity in brain homogenates. We suggest that erythrocyte catalase activity may play an important antioxidant role in the central nervous system, and that the adjunct therapy with GM1 may be of value in clinical conditions in which increased blood flow is associated to a better prognosis, such as obstructive vascular and neurodegenerative diseases.

## LISTA DE ABREVIATURAS

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| CAT                           | catalase  |
| EANs                          | espécies reativas de nitrogênio                       |
| EAOs                          | espécies reativas de oxigênio                         |
| ERK1/ERK2                     | quinase regulada por sinal extracelular 1 e 2         |
| GM1                           | monosialogangliosídeo GM1                             |
| GRd                           | glutaciona redutase                                   |
| GSH                           | glutaciona reduzida                                   |
| GPx                           | glutaciona peroxidase                                 |
| GSSG                          | glutaciona oxidada                                    |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | peróxido de hidrogênio                                |
| i.p.                          | intraperitoneal                                       |
| i.v.                          | intravenoso   |
| MPTP                          | 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina             |
| NADH                          | dinucleotídeo nicotinamida adenina (reduzida)         |
| NADPH                         | dinucleotídeo nicotinamida adenina fosfato (reduzida) |
| NGF                           | fator de crescimento neural                           |
| NMDA                          | N-metil D-aspartato                                   |
| O <sub>2</sub> <sup>•</sup>   | radical superóxido                                    |
| PKC                           | proteína quinase C                                    |
| RLs                           | radicais livres                                       |
| •OH                           | radical hidroxila                                     |
| RNAM                          | ácido ribonucléico mensageiro                         |
| SGB                           | síndrome de Guillain Barré                            |
| SNC                           | sistema nervoso central                               |
| SOD                           | superóxido dismutase                                  |
| Trk                           | receptores de tirosina quinases                       |
| TrkA                          | receptor de tirosina quinase do tipo A                |
| TrkB                          | receptor de tirosina quinase do tipo B                |
| TrkC                          | receptor de tirosina quinase do tipo C                |

---

## **1 INTRODUÇÃO**

## **1.1 Gangliosídeos**

### **1.1.1. Histórico**

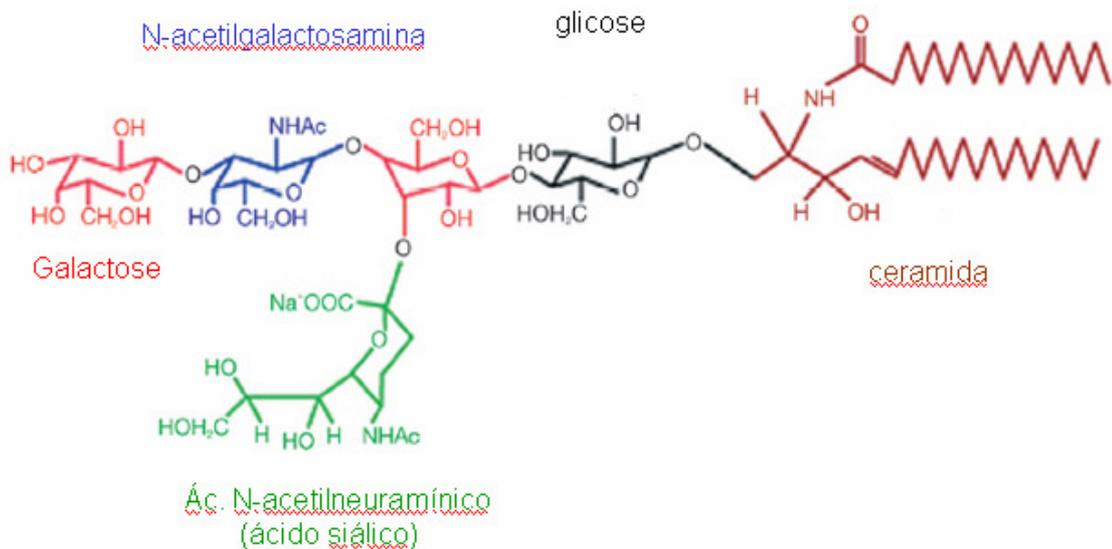
Os gangliosídeos foram primeiramente identificados na década de 30, por Ernest Klenk, que sugeriu o nome gangliosídeos devido à associação destes compostos com a matéria cinzenta do tecido cerebral, ou também chamada de *Gangliozellen* (Klenk, 1935). Durante os anos de 1950 e 1960, um grande número de estudos confirmou a abundância dos gangliosídeos no cérebro e células neurais (neurônios e glia) (Derry & Wolf, 1967; Svennerholm, 1956), e a onipresença dos gangliosídeos em todos os tipos de células sugere que eles são importantes na fisiologia celular. Sendo assim, sua alta concentração em neurônios em desenvolvimento e neurônios adultos, maior que 10% do conteúdo lipídico total, indica um papel crítico dos gangliosídeos no sistema nervoso (Leeden, 1978).

### **1.1.2. Estrutura química e nomenclatura**

Gangliosídeos são classificados como glicosfingolipídios cujo componente característico da molécula é o ácido siálico. O número de resíduos de ácido siálico por molécula de gangliosídeo varia de 1 a 7. O ácido siálico mais abundante entre os gangliosídeos cerebrais é o N-acetil-neuramínico, mas também pode ser o N-glicolil-neuramínico (Yu & Saito, 1992). O gangliosídeo GM1 (GM1), que será estudado neste trabalho, contém um resíduo de ácido siálico e quatro açúcares neutros. Os resíduos de ácido siálico se encontram unidos a oligossacarídeos neutros através de ligações  $\alpha$ -glicosídicas, sendo que estes resíduos de açúcares neutros podem ser: a glicose, a galactose, a N-acetilglicosamina, a N-acetilgalactosamina e a fucose, que em diferentes combinações conferem heterogeneidade aos diferentes tipos de gangliosídeos (Svennerholm, 1994).

Os gangliosídeos são classificados em diferentes séries (hemato, gânglio, lacto, globo, gala, neolacto, isoglobo), baseado na seqüência de oligossacarídeos ligados a base ceramida, sendo que os gangliosídeos que predominam no tecido nervoso pertencem à série gânglio (Tettamanti & Riboni, 1993). A porção oligossacarídica liga-se, por meio de uma ligação  $\alpha$ -glicosídica, a uma ceramida, que é constituída de uma cadeia longa de ácido graxo e uma esfingosina (Tettamanti & Riboni, 1993).

Atualmente, a nomenclatura utilizada para designar os diferentes tipos de gangliosídeos é aquela proposta por Svennerholm (1963). Segundo essa classificação, os gangliosídeos são designados pela letra G seguida de M (monossialo-), D (dissialo-), T (trissialo-), Q (tetrassialo), P (pentassialo-), H (hexassialo-) ou S (heptassialo-) de acordo com o número de resíduos de ácido siálico (1 a 7, respectivamente) seguido de um número que, por convenção, é a subtração da quantidade de resíduos de açúcares neutros presentes na molécula, do número 5 (Figura 1). Finalmente, adiciona-se a letra a ou b para indicar a configuração do isômero quando for o caso. Assim, o GM1, considerado o protótipo do grupo, pertence à série gânglio e é constituído por um resíduo de ácido siálico e quatro açúcares neutros (Figura 1).



**Figura 1:** Estrutura química do Monossialotetra-hexosilgangliosídeo (GM1).

Fonte: Adaptado de Mocchetti, 2005.

### 1.1.3. Localização

Os gangliosídeos são componentes das membranas plasmáticas, localizando-se principalmente na parte externa dessas membranas (Hakomori, 1981) de todos os tecidos de vertebrados (Ledeen & Yu, 1982), concentrando-se mais no sistema nervoso (Wiegandt, 1985), onde representam cerca de 10 a 12% do conteúdo total de lipídios (Ledeen, 1978). No cérebro de mamíferos os gangliosídeos predominantes são o GM1, o GD1a, o GD1b o GT1b e o GQ1b, os quais correspondem de 80 a 90% do total de gangliosídeos (Ando et al., 1978). No tecido nervoso dos vertebrados, os gangliosídeos estão localizados assimetricamente na camada externa da membrana plasmática, com a porção oligossacarídica exposta na superfície extracelular e a porção ceramida inserida na membrana, em contato com os vários componentes lipídicos e protéicos (Tettamanti & Riboni, 1993). Devido a essa distribuição assimétrica, e também à sua diversidade

química, os gangliosídeos estão sujeitos a interações com moléculas sinalizadoras extracelulares (Dal Toso et al., 1988).

Embora estejam presentes em toda a superfície neuronal, os gangliosídeos se encontram mais concentrados na região sináptica (Hansson et al., 1977; Yu & Saito, 1989), sendo sintetizados no corpo celular do neurônio e posteriormente transferidos para locais apropriados pelo sistema de transporte axonal (Forman & Ledeen, 1972). Portanto, uma pequena quantidade dessas substâncias localiza-se intracelularmente, ligada às organelas responsáveis pelo transporte intracelular e metabolismo e aos carreadores protéicos solúveis (Sonnino et al., 1979).

#### **1.1.4. Funções dos gangliosídeos**

O fato de haver uma alta concentração de gangliosídeos no tecido nervoso em comparação a outros tecidos sugere que eles sirvam a um propósito específico neste tecido (Ledeen, 1978). Muitos estudos sugerem a participação dos gangliosídeos no desenvolvimento neuronal, na sinaptogênese e transmissão sináptica, e acredita-se que eles exerçam seu papel biológico por dois mecanismos: (1) atuando como receptores, podendo interagir com outras células, com a matriz extracelular ou com substâncias exógenas e (2) atuando como moduladores de proteínas funcionais de membrana, tais como receptores de fatores tróficos e transportadores (Hakomori et al., 1981, 1990). Dentre as ações endógenas propostas para os gangliosídeos foi sugerida a participação dessas substâncias nos processos de crescimento, reconhecimento e diferenciação celular (Hakomori et al., 1981). Aumentos significativos no conteúdo dos principais gangliosídeos durante alguns estágios da diferenciação neuronal sugerem uma necessidade funcional dessas substâncias nos processos de neuritogênese e sinaptogênese (Vanier et al., 1971). Estudos têm mostrado que, quando administrados

em cultura de neurônios *in vitro*, os gangliosídeos promovem efeitos neuronotróficos (relacionados à sobrevivência e manutenção do neurônio) e neuritogênicos (que envolvem aumento no número, tamanho e/ou ramificação dos processos neuronais, Ledeen, 1984). As propriedades neuritogênicas e neurotróficas das gangliosídeos podem estar relacionadas a potencialização da ação do fator de crescimento neural (NGF) promovida por estas substâncias. O mecanismo pelos quais os gangliosídeos potencializam as ações do NGF ainda é controverso. Gonatas e colaboradores (1983) sugeriram que esses glicosfingolipídios exerceriam seus efeitos após a internalização do NGF pela célula. Por outro lado, Mutoh e colaboradores (1995) verificaram que o GM1 associa-se diretamente com o receptor para NGF (TRK), e regula sua função. Em outro estudo foi sugerido que, além da ativação do receptor de NGF, o GM1 promoveria a fosforilação das proteínas de transdução de sinal responsivas ao NGF (Rabin & Mocchetti, 1995), e também a restauração dos níveis de NGF e RNAm para NGF no córtex, hipocampo e estriado de cérebro de ratos adultos (Duchemin et al., 1997).

Com base nesses estudos, acredita-se que o crescimento e a maturação do SNC parecem ser particularmente influenciados por esses glicosfingolipídios, uma vez que a concentração e a topografia de certos tipos de gangliosídeos sofrem importantes mudanças durante o desenvolvimento cerebral (Karpiak & Mahadik, 1990). Além disso, foi proposto que gangliosídeos individuais podem ser usados como marcadores dos estágios de diferenciação celular, sendo que o GD3 e o GD2 estão relacionados com a proliferação celular; o GT1a, GT1c, GQ1c e o GP1c com o crescimento dos neuritos e arborização; o GD1a e o GT1b com a formação das sinapses e o GM1 e o GM4 com a mielinização (Rahmann, 1995).

A presença de altas concentrações de gangliosídeos nas terminações sinápticas levou à investigação de um possível papel dessas substâncias na neurotransmissão

(Hadjiconstantinou & Neff, 1998a). De fato, foi verificado que os gangliosídeos localizados nos terminais sinápticos ligam cálcio com grande afinidade e, portanto, seriam candidatos a carreadores do cálcio necessário para a liberação de neurotransmissores (Svennerholm, 1980). Além disso, Ando (1997) mostrou que os gangliosídeos GM1 e GQ1b são capazes de aumentar o influxo de íons cálcio ( $Ca^{++}$ ) em sinaptossomas, indicando que os gangliosídeos modulam os processos eletroquímicos de transmissão e, provavelmente, o armazenamento de informações no sistema nervoso central (Rahmann, 1995).

Além disso, foi proposto que os efeitos neuroprotetores do GM1 podem ser mediados, pelo menos em parte, por tirosinas quinases (Hakomori & Igarashi, 1993) associadas com receptores de fatores de crescimento, assim como, a proteína quinase C. O GM1 não só mimetiza, mas também potencializa a ação de neurotrofinas em alguns sistemas neuronais *in vivo* (Hadjiconstantinou & Neff, 1998a; 1998b). A fosforilação dos receptores de tirosina quinases (Trk) e sua ativação no cérebro *in situ* e *in vivo*, iniciam a transdução de sinal que resulta na ativação das quinases ERK1 e ERK2 (Singleton et al., 2000; Duchemin, et al., 2002; Mo et al., 2005). Farooqui e colaboradores (1997) concluíram que os efeitos neurotróficos exercidos pelo GM1 se devem à facilitação da dimerização e conseqüente ativação dos receptores de tirosina quinase do tipo A (TrkA). Contudo, atualmente sabe-se que o GM1 induz a ativação dos três tipos de receptores para neurotrofinas: TrkA>TrkC>TrkB (Duchemin et al., 2002). Além disso, foi proposto que os gangliosídeos são inibidores da PKC e impedem a translocação da enzima do citosol para a membrana, e seus efeitos protetores poderiam ser explicados pela inibição da translocação e conseqüente ativação da PKC (Vaccharino et al., 1987; Favaron et al., 1988).

Diversos efeitos também foram atribuídos aos gangliosídeos sobre a plasticidade da transmissão sináptica. O tratamento com gangliosídeo promove a recuperação do sistema dopaminérgico (Toffano et al., 1983; Raiteri et al., 1985) contra o parkinsonismo experimental induzido por 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina (MPTP), aumentando a síntese de dopamina (Toffano et al., 1983) e restaurando o conteúdo deste neurotransmissor (Hadjiconstantinou et al., 1986; Weihmuller et al., 1988; Fazzini et al., 1990; Schneider, 1992; Schneider & DiStefano, 1995). De fato, o GM1 aumenta a atividade da tirosina hidroxilase e promove a recuperação do déficits comportamental apresentado em decorrência do tratamento com MPTP em ratos e macacos (Weihmuller et al., 1988; Fazzini et al., 1990; Schneider et al., 1992). Fusco e colaboradores (1993) mostraram que o GM1 protege contra a neurodegeneração induzida pela exposição aguda e crônica a 6-hidroxi-dopamina em culturas de células neuronais, ressaltando a importância deste gangliosídeo em condições patológicas que envolvem o sistema dopaminérgico. Além do sistema dopaminérgico, existem diversos estudos na literatura que mostram efeitos do GM1 em vários outros sistemas de neurotransmissores, como o colinérgico, o noradrenérgico e o serotoninérgico (Hadjiconstantinou e & Neff, 1998a).

Os gangliosídeos exógenos, quando adicionados a um meio de incubação podem estar na forma de monômeros, oligômeros ou micelas, e sua incorporação a células intactas e preparações de membrana é altamente dependente da concentração do gangliosídeo no meio e do tempo de incubação (Saqr et al., 1993). Quando administrados sistemicamente, muito pouco da dose é capaz de ultrapassar a barreira hemato-encefálica, sendo que somente 1 a 3% de GM1 atinge o sistema nervoso central (Orlando et al., 1979; Ghidoni et al., 1989). Gangliosídeos semi-sintéticos como o LIGA-20, que é um análogo do GM1, com atividade neuroprotetora (Wu et al., 2005),

atinge concentrações cerebrais maiores e por períodos mais longos (Polo et al., 1994), pois atravessam a barreira hemato-encefálica mais eficientemente (Wells et al., 1996).

A utilização clínica de gangliosídeos exógenos, especialmente do monossialogangliosídeo, tem sido proposta para uma grande diversidade de patologias relacionadas ao sistema nervoso: lesão de medula espinhal (Mahadik & Karpiak, 1988; Geisler et al., 1991), neuropatias periféricas (Schneider et al., 1994), doenças cerebrovasculares (Carolei et al., 1991), isquemia (Lazzaro et al., 1994), hipóxia (Krajnc et al., 1994), doenças de Parkinson (Schneider, 1998), Alzheimer (Svennerholm et al., 2002) e traumatismo crânio-encefálico (Chen et al., 2003).

Foi proposto que os gangliosídeos normalizam vários processos metabólicos e aumentam a viabilidade de culturas de neurônios expostos a altas concentrações de aminoácidos excitatórios (Favaron et al., 1988; Costa et al. 1993; Lazarewicz et al., 1994). Deste modo, um possível papel protetor dos gangliosídeos na neurotoxicidade por aminoácidos excitatórios tem sido investigado. Como esperado, o GM1 atenua a citotoxicidade promovida pelo L-aspartato em cultura de células cerebelares de rato (Skaper et al., 1990), por glutamato e cainato (Favaron et al., 1988) e também por N-metil D-aspartato (NMDA) (Facci et al., 1990). Outro estudo mostra que o tratamento com GM1 (30 mg/kg/dia, i.p., por três dias), reduz o aumento de aminoácidos excitatórios no líquido de diálise após uma lesão isquêmica (Lombardi & Moroni, 1992), e atenua a perda neuronal induzida por anóxia (Skaper et al., 1989). De fato, a administração de GM1 reduz o edema e melhora o metabolismo cerebral induzido por traumatismo crânio-encefálico (Chen et al., 2003) e o dano isquêmico-hipóxico em cérebro fetal, sem causar hipotensão ou comprometimento metabólico (Tan et al., 1993). Kwak e colaboradores (2005) reportaram um aumento na expressão do GM1 no

córtex cerebral de animais que foram submetidos a uma lesão isquêmica em relação ao córtex de animais controle.

Contudo, existem poucos estudos na literatura relacionando o efeito da administração de GM1 sobre a microcirculação cerebral. Neste sentido, Tanaka e colaboradores (1986) mostraram que o GM1 na concentração de 30mg/kg, 30 minutos após uma lesão isquêmica em gatos, aumenta o fluxo sanguíneo local, e reduz o dano-isquêmico. Chen e colaboradores também sugerem que o GM1 melhora o fluxo sanguíneo cerebral no traumatismo crânio-encefálico, reduzindo a hipóxia, a isquemia e peroxidação lipídica causadas pela lesão (Chen et al., 2003).

Svennerholm e colaboradores (2002) verificaram o efeito da administração intracerebroventricular de GM1 em pacientes com doença de Alzheimer, por um período de um ano, e observou uma significativa melhora física e mental dos pacientes, assim como uma tendência de aumento no fluxo sanguíneo cerebral (Svennerholm et al., 2002). Estes estudos sugerem um envolvimento do GM1 no aumento do fluxo sanguíneo cerebral, porém nenhum estudo investigou especificamente o efeito da administração de GM1 sobre a circulação cerebral.

O GM1 tem sido proposto como um agente anticonvulsivante, uma vez que ele inibe a atividade epileptiforme recorrente em ratos induzida pela injeção intracerebral de anticorpos contra gangliosídeos cerebrais (Karpiak et al., 1976; 1981) e atenua as convulsões induzidas por soman (Ballough et al., 1998), ácido metilmalônico (Fighera et al., 2003), ácido glutárico e pentilenotetrazol (Fighera et al., 2006). Entretanto, o GM1 não altera as convulsões induzidas por estimulação elétrica em ratos (Albertson et al., 1987), e não está bem esclarecido se seus efeitos neuroprotetores estão relacionados com suas propriedades antioxidantes.

Essa diversidade de situações nas quais o GM1 parece causar neuroproteção provavelmente está relacionada à considerável variedade de mecanismos de ação e de efeitos farmacológicos promovidos por esse glicosfingolípido. Por outro lado, é possível que este gangliosídeo atue em uma via comum a várias condições/doenças, como por exemplo, o estresse oxidativo. Nessa linha de raciocínio, tem sido sugerido que um possível mecanismo de neuroproteção do gangliosídeo GM1 seja devido à sua ação antioxidante, tanto *in vivo* (Figuera et al., 2003; 2004; 2006) como *in vitro* (Maulik et al., 1993; Avrova et al., 1994; 2002). De fato, o GM1 inibe a liperoxidação e protege receptores e enzimas, como a Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase, contra o dano oxidativo induzido pela isquemia (Mahadik et al., 1989) e por glutamato (Avrova et al., 2002). Entretanto, os mecanismos pelo qual o GM1 exerce seu efeito antioxidante ainda não estão completamente esclarecidos.

Maulik e colaboradores sugerem que esse glicosfingolípido tenha atividade antioxidante direta, já que é capaz de neutralizar a ação dos radicais livres, como os radicais hidroxila e superóxido, induzidos por isquemia em miocárdio de ratos *in vitro* (1993). Tiurin e colaboradores (1992) sugeriram que os gangliosídeos são inibidores da fosfolipase A<sub>2</sub>, responsável pela liberação do ácido araquidônico das membranas para posteriormente ser convertido em prostaglandinas pela ciclooxigenases, gerando assim espécies reativas. Lazarewics e colaboradores (1994), mostraram que a administração de GM1 diminui drasticamente o conteúdo de prostaglandinas e eicosanóides que se acumulam no cérebro após uma lesão isquêmica. Neste contexto, Mahadik e colaboradores (1993) observaram que a administração de GM1 (10 mg/kg, i.m.) aumenta os níveis de enzimas antioxidantes, catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase, após uma lesão isquêmica no córtex. Estudos do nosso grupo mostraram que a administração sistêmica de GM1 (2 injeções de 50 mg/kg, i.p., separadas por um

intervalo de 24 horas) diminui as convulsões e a lipoperoxidação induzidas por metilmalonato (Figuera et al., 2003), e a lipoperoxidação e carbonilação protéica induzidas por ácido glutárico e pentilenotetrazol (Figuera et al., 2006), bem como aumenta o conteúdo de ácido ascórbico estriatal (Figuera et al., 2003). Interessantemente, essa mesma dose de GM1 aumentou a atividade catalásica cerebral e reduziu a quimioluminescência no córtex cerebral *ex vivo*. No entanto, em homogeneizado de córtex *in vitro* o GM1 reduziu a atividade catalásica e não causou efeito significativo sobre a quimioluminescência (Figuera et al., 2003; 2004), mostrando que este gangliosídeo não tem ação antioxidante intrínseca em nosso modelo. Portanto, o mecanismo pelo qual o GM1 aumenta a atividade da catalase, e seu efeito em outras estruturas cerebrais não está bem esclarecido.

## 1.2. Radicais Livres e Espécies Reativas

### 1.2.1. Conceito e Formação dos Radicais Livres e Espécies Reativas

Do ponto de vista químico, um radical livre (RL) é definido como qualquer átomo, grupo de átomos ou moléculas capazes de existir sob forma independente e que contém um ou mais elétrons desemparelhados na camada de valência (Del Maestro, 1980; Southorn & Powis, 1988; Halliwell & Gutteridge, 1999). Portanto, os radicais livres podem ser formados pela adição ou pela perda de um elétron de uma substância não-radical. Entretanto, existem compostos igualmente reativos aos radicais livres que não possuem elétron não-pareado na última camada e, por isso não podem ser classificados como radicais livres (Dröge, 2002). Essas substâncias são classificadas de maneira mais ampla como espécies reativas do oxigênio (EAOs) ou espécies reativas de nitrogênio (EANs).

As EAOs geralmente têm uma curta duração de vida e sua recombinação química é quase imediata. Estudos mostram que elas têm uma forte tendência para estabilizar sua órbita externa, e captam um elétron de outro átomo ou molécula que se torna uma molécula radicalar (Rice-Evans & Burdon, 1993).

Uma fonte importante de RLs é o sistema de transporte de elétrons mitocondrial (Del Maestro, 1980), sendo seu principal sítio de formação o complexo citocromo b-ubiquinona (Tyler, 1975). Na mitocôndria, a enzima citocromo-oxidase promove a redução completa de uma molécula de  $O_2$  em uma molécula de água e, para isso, são necessários quatro elétrons. Contudo, nem sempre o oxigênio se transforma diretamente em água, em consequência de sua configuração eletrônica. A molécula de oxigênio tem forte tendência, durante as reações, em receber um elétron de cada vez formando uma série de intermediários tóxicos e reativos (Meneghini, 1987), tais como: radical

superóxido ( $O_2^{\bullet}$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), e o radical hidroxila ( $\bullet OH$ ). O primeiro e o último destes apresentam elétrons desemparelhados e são classificados como RLs, já o  $H_2O_2$  não tem elétrons não-pareados na última camada e é classificado como uma EAO.

O superóxido é o primeiro intermediário formado a partir da redução incompleta do oxigênio molecular na formação da  $H_2O$  (Harris, 1995), e a partir dele podem se formar outras espécies ativas de oxigênio como o radical hidroxila e o peróxido de hidrogênio (Esterbauer et al., 1986). Muitos sistemas enzimáticos catalisam a redução do oxigênio à radical superóxido, entre eles podemos citar como exemplos: a xantina oxidase, a aldeído oxidase, a flavina oxidase e as peroxidases (Fridovich, 1976; McCord, 1987). Várias outras enzimas como aquelas que catalisam a formação de prostaglandinas (ciclooxigenases) e leucotrienos (lipoxigenases), também são fontes de superóxido (Machlin & Bendich, 1987).

Em condições fisiológicas, o  $H_2O_2$  é formado na mitocôndria em função da atividade metabólica (Chance et al., 1979). Tem sido mostrado que, em alguns órgãos, a atividade celular leva à formação de  $H_2O_2$ , tanto pelos peroxissomos quanto por enzimas citosólicas (Boveris & Chance, 1973; Chance et al., 1979). O  $H_2O_2$  é gerado a partir do superóxido por meio de dismutação, sendo esta reação catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD) (Fridovich, 1975; 1978). O  $H_2O_2$  não é um radical livre por si só, mas em altas concentrações pode reagir com o superóxido (reação de Haber-Weiss) ou com o ferro na reação de Fenton formando o radical hidroxila, que é altamente reativo (Halliwell, 2001).

## 1.2.2 Radicais Livres e Sistema Nervoso Central

As EAOs são necessárias para o funcionamento normal do organismo e são continuamente produzidas e neutralizadas pelo sistema de defesa antioxidante. Entretanto, quando as espécies reativas são produzidas em altas concentrações, ou quando as defesas antioxidantes são deficientes, elas podem causar prejuízo na função celular, apoptose e necrose (Bergendi et al., 1999), caracterizando o “estresse oxidativo”. Esse desequilíbrio entre a produção celular de espécies reativas e as defesas antioxidantes pode representar um mecanismo fundamental para o desenvolvimento de algumas patologias em seres humanos (Halliwell & Gutteridge, 1999).

Embora todos os tecidos dos organismos aeróbicos possam sofrer dano oxidativo, o sistema nervoso é o mais suscetível às espécies reativas de oxigênio. Uma das razões é o seu alto consumo de  $O_2$ , já que o sistema nervoso é responsável por aproximadamente 20% do consumo basal de  $O_2$  corporal, apesar de seu peso corresponder a apenas 2% do peso corporal. Portanto, há uma grande quantidade de  $O_2$  para uma massa de tecido relativamente pequena (Halliwell & Gutteridge, 1999). Além disso, outros fatores também contribuem para tornar o cérebro vulnerável às reações de oxidação, tais como as altas concentrações de lipídios poli-insaturados, que servem como substrato para peroxidação lipídica e a deficiência de mecanismos protetores antioxidantes. A baixa atividade de enzimas antioxidantes e sua localização nas células gliais (Floyd & Hensley, 2002) fazem com que os neurônios sejam menos protegidos contra as espécies reativas geradas no cérebro. Além disso, regiões específicas do cérebro, como a substância negra, caudato, putâmen e globo pálido possuem altas concentrações de ferro (Andrasi, et al., 2000), que associadas aos níveis cerebrais elevados de vitamina C (Miele et al., 1990), possibilitam a reação de Fenton (Nold & Wennemers, 2004).

Sendo assim, a descoberta de novas substâncias com ação antioxidante tem desper-

tado o interesse da medicina para o tratamento de patologias relacionadas à formação de radicais livres. Dentre essas substâncias está o gangliosídeo GM1 (Avrova et al., 1994), um composto com ação neuroprotetora em modelos animais de Parkinson induzidos por MPTP, Alzheimer e Huntington (Weihmuller et al., 1988; Fazzini et al., 1990). Baseando-se nestes resultados a utilização de gangliosídeo GM1 tem sido proposta para uma grande diversidade de patologias relacionadas ao sistema nervoso, como lesão da medula espinhal (Mahadik & Karpiak, 1988; Geisler et al., 1991), neuropatias periféricas (Schneider et al., 1994) e doenças cerebrovasculares (Carolei et al., 1991).

Embora se saiba a capacidade dos gangliosídeos em produzir melhora neurológica e funcional clinicamente significativa e duradoura ainda não foi demonstrada em algumas situações. Estudos maiores e bem controlados, com períodos adequados de tratamento são necessários para avaliar os seus benefícios a longo prazo. Além de controversa eficácia, numerosos casos de Síndrome de Guillain-Barré (SGB) ou outras formas de polineuropatia motora aguda têm sido atribuídas a terapia com gangliosídeos. Desde 1985, foram relatados, espontaneamente, na Alemanha, Itália e Espanha, pelo menos 45 casos de SGB associados ao uso de produtos com gangliosídeos combinados para o tratamento de neuropatia periférica e outras desordens neurológicas. Tipicamente, a SGB tem ocorrido quatro semanas após o tratamento com gangliosídeos; embora a recuperação parcial ou completa em alguns pacientes tenha sido evidente, relatam-se casos fatais. Suspeita-se que as reações envolvam um mecanismo imunológico, uma vez que os gangliosídeos são preparados a partir de córtex cerebral bovino.

Muitos casos de SGB também foram relacionados à terapia com monossialogangliosídeo puro, que também é extraído de cérebro bovino. A experiência clínica com esta formulação, contudo, é substancialmente menor que com os

gangliosídeos combinados. A correlação entre o uso de gangliosídeos e a ocorrência da SGB é forte, sendo suportadora de uma hipótese de causa/efeito.

A eficácia incerta e o potencial dos gangliosídeos para induzir complicações neurológicas severas, como a SGB, devem limitar sua aceitação e a difusão de seu uso. Contudo, são necessárias investigações complementares para se estabelecer uma relação causal definitiva.

### **1.2.3 Sistema de defesas antioxidantes contra as Espécies Reativas de Oxigênio**

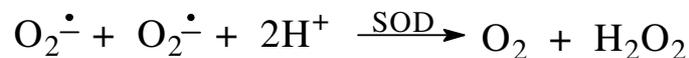
Os seres vivos dispõem de mecanismos protetores para evitar o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (Halliwell, 1994), que incluem mecanismos enzimáticos e não-enzimáticos evitando assim o dano a lipídios, a proteínas e ácidos nucleicos. As principais enzimas antioxidantes são a catalase, a superóxido dismutase e a glutathione peroxidase que evitam o acúmulo de  $O_2^{\bullet-}$  e de  $H_2O_2$ , e a conseqüente produção de radicais  $\bullet OH$ , contra o qual não existe nenhum sistema enzimático específico de defesa.

As defesas não-enzimáticas incluem os antioxidantes lipofílicos (tocoferóis, carotenóides e bioflavonóides) e hidrofílicos (glutathione e ascorbato, além da albumina sérica, do ácido úrico e do ácido dehidroascórbico) (Halliwell & Gutteridge, 1999; Cao et al., 1997; Heffner & Repine, 1989).

## 1.2.4 Defesas enzimáticas

### 1.2.4.1. Superóxido Dismutase

A superóxido dismutase (SOD) (EC 1.15.1.1, superóxido: superóxido oxidoreductase) é uma enzima essencial para todas as células aeróbicas, pois catalisa a dismutação do radical superóxido, uma importante EAO, formando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e O<sub>2</sub> (Figura 2).



**Figura 2** – Dismutação do radical superóxido formando peróxido de hidrogênio e O<sub>2</sub>.

Existem três tipos de superóxido dismutase: as que contêm cobre e zinco no sítio ativo (Cu Zn-SOD) e são encontradas no citosol em maior quantidade, mas estão presentes também nos peroxissomas, lisossomas e no espaço intermembranas da mitocôndria (Fridovich, 1975); as que contêm manganês (Mn-SOD) e estão presentes na matriz mitocondrial, que correspondem à cerca de 60% do total de enzima, visto que a maior quantidade de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> é produzida na mitocôndria ao invés do citosol (Fisher, 1987); e as que contêm ferro, e que são encontradas em plantas e bactérias (Fridovich, 1975; Chance et al., 1979), sendo que a distribuição regional e subcelular da SOD promovem uma proteção adequada contra o radical superóxido em condições fisiológicas. Este grupo de enzimas catalisa a reação de dois radicais superóxido, com conseqüente formação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que é menos reativo e é degradado por outras enzimas (catalase ou glutathiona peroxidase). Essa reação pode acontecer espontaneamente em condições fisiológicas, porém quando catalisada pela SOD a velocidade de dismutação é 10<sup>4</sup> vezes

maior (Chance et al., 1979; Southorn & Povis, 1988). A catalase é a enzima responsável pela detoxificação do peróxido de hidrogênio formado pela SOD, sendo considerada uma enzima neutralizadora de anions superóxido indiretamente (Wassmann et al., 2004).

Em um estudo anterior do nosso grupo não foi observada diferença na atividade da SOD em homogeneizado de córtex após o tratamento com GM1 (50 mg/kg, i.p.) (Fighera et al., 2004), embora Mahadik e colaboradores (1993), utilizando outro protocolo experimental (10 mg/kg, i.m.) reportaram um aumento no nível das enzimas antioxidantes após uma lesão isquêmica, nos animais tratados com o gangliosídeo.

#### **1.2.4.2 Glutathione Peroxidase**

A glutathione peroxidase (GPx) (EC 1.11.1.9, glutathione: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidoreductase), quando foi descoberta por Mills em 1960, era considerada uma enzima responsável apenas pela catálise do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, tal como a catalase. Hoje, esta enzima, que é encontrada em muitos tecidos animais, é considerada um dos principais sistemas antioxidantes, pois reage com uma variedade de hidroperóxidos orgânicos além do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Wendel, 1981; Halliwell, 2001), e é responsável pela degradação do peróxido de hidrogênio no sistema nervoso junto com a catalase. A diferença principal entre elas está no Km para o substrato que é mais elevado para a catalase (Km H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> >10mM) em relação a glutathione peroxidase (Km 1μM) (Flohé & Brandt, 1969; Vetrano et al., 2005).

Há dois tipos de GPx: a que utiliza o selênio como cofator, encontrada tanto na mitocôndria como no citosol; e a que não depende de selênio, encontrada no citosol e responsável pela metabolização de hidroperóxidos orgânicos.

A GPx catalisa a reação de hidroperóxidos com a glutathiona reduzida (GSH) para formar glutathiona oxidada (GSSG) e produto de redução do hidroperóxido (Figura 3).

Fisiologicamente, a GPx atua acoplada a enzima glutathiona redutase (GRd) que, por sua vez, catalisa redução de GSSG, usando NADPH como coenzima (Figura 3) (Mills, 1960; Maiorino et al., 1990).



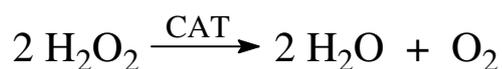
**Figura 3** - (A) Reação catalisada pela GPx. O substrato também pode ser outros hidroperóxidos além do  $\text{H}_2\text{O}_2$ . (B) Reação de redução da GSSG pela glutathiona redutase, usando NADPH como coenzima.

Estudos prévios do nosso grupo não mostraram diferença na atividade da GPx e no conteúdo de grupos tióis não-protéicos, em homogeneizado de córtex após o tratamento com GM1 (50 mg/kg, i.p.) (Figuera et al., 2004). Mahadik e colaboradores (1993), utilizando outro protocolo experimental reportaram um aumento no nível das enzimas antioxidantes após uma lesão isquêmica, sugerindo que o tratamento com GM1 protege contra danos causados por EAOs, assim como foi demonstrado por Maulik, que os gangliosídeos podem neutralizar diretamente radicais superóxido e hidroxila em miocárdio de ratos (Maulik et al., 1993).

### 1.2.4.3 Catalase

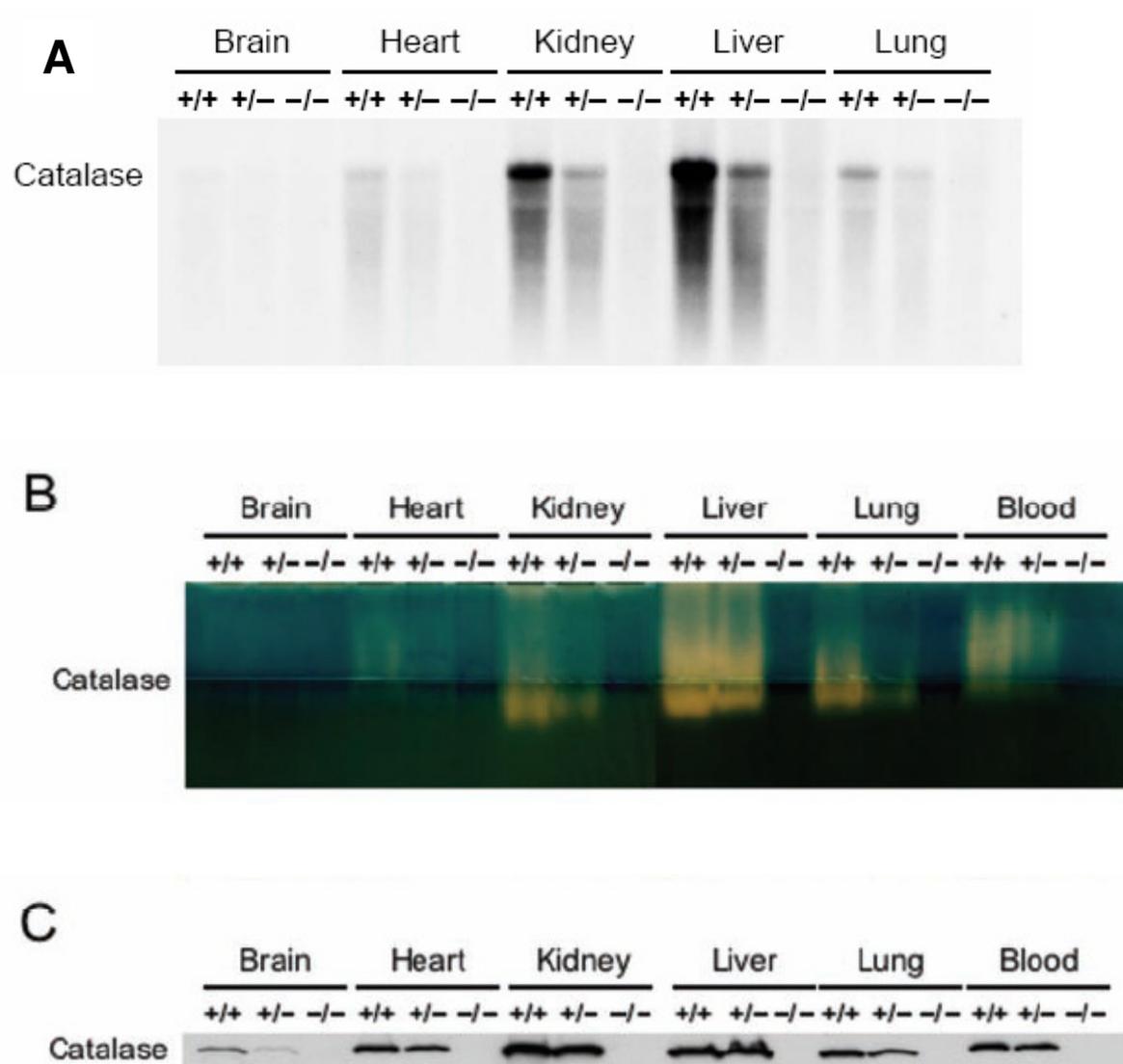
A catalase (CAT) (EC 1.11.1.6; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidoreductase) é uma proteína homotetramérica que contém um grupo heme (Chance et al., 1979), capaz de decompor o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) em água e oxigênio molecular (Oshino et al., 1973).

A figura 4 mostra a decomposição do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pela catalase:



**Figura 4** – Reação de decomposição do peróxido de hidrogênio pela catalase.

A catalase está presente em todos os tipos de células de mamíferos e com exceção dos eritrócitos, está localizada num componente subcelular chamado peroxissoma e no retículo endoplasmático (Thomas & Aust, 1985). É expressa em vários tecidos, mas de forma heterogênea, pois tem alta atividade no fígado, sangue e rins, e em menor proporção no tecido cardíaco, pulmão e cérebro (Ho et al., 2004), (Figura 5). Mueller e colaboradores (1997) mostraram que a catalase é a enzima responsável por remover cerca de 90% do peróxido de hidrogênio gerado nos eritrócitos sugerindo um papel importante para a catalase, visto que as células sanguíneas da série vermelha estão sob estresse oxidativo constante, devido à alta tensão de oxigênio e geração de espécies reativas formadas na auto-oxidação da hemoglobina.



**Figura 5:** Representação da expressão de “blots” de RNA mensageiro (A), atividade “in situ” (B) e “blots” de proteína (C) para a catalase em diferentes tecidos. Fonte: Ho et al., 2004.

Devido à sua pouca expressão de RNAm no cérebro (Figura 5) ela tem sido considerada uma enzima secundária na neutralização dos radicais livres (Reiter, 1995). No entanto, Moreno e colaboradores (1995) mostraram que neurônios mais resistentes

ao dano isquêmico apresentaram maior imunoreatividade para a catalase, enquanto que neurônios mais suscetíveis ao dano mostraram menor imunoreatividade, destacando o papel crítico desta enzima contra o estresse oxidativo em patologias como a isquemia.

A catalase além de remover o  $H_2O_2$ , também tem papel relevante na detoxificação indireta do radical superóxido, que é convertido em  $H_2O_2$  pela superóxido dismutase, e então decomposto pela catalase (Wassmann et al., 2004).

A catalase é uma enzima crítica na defesa das células aeróbicas contra o estresse oxidativo. Recentes estudos mostraram que a atividade da catalase é estimulada por uma família de proteínas tirosina-quinases, as c-Abl e Arg. Os mecanismos responsáveis pela regulação da catalase são pouco conhecidos, mas foi mostrado que a c-Abl e Arg fosforilam a catalase, ativando-a em resposta ao aumento dos níveis de  $H_2O_2$  nas células (Cao et al., 2003a). Estes estudos indicam que c-Abl e Arg além de ativar a atividade da catalase, representam uma via de sinalização importante na regulação da apoptose desencadeada pelo excesso de radicais livres (Cao et al., 2003b). Existem muitos estudos relacionando a regulação da catalase por neurotrofinas, entre elas o NGF, que por sua vez tem seu efeito potencializado por gangliosídeos (Katoh-Semba et al., 1984).

Como o sistema nervoso central é especialmente vulnerável à isquemia e a neurotoxicidade induzida por inibidores metabólicos e radicais livres, nosso objetivo é investigar o mecanismo de ação do GM1 sobre a atividade da catalase, no hipocampo, no córtex cerebral, no estriado e no sangue de ratos, visto que um aumento na atividade desta enzima pode constituir uma nova estratégia no desenvolvimento de tratamentos de diversas patologias onde o estresse oxidativo tem papel importante.

---

## **2 OBJETIVOS**

## **2.1 Objetivo Geral**

Avaliar o efeito da administração intraperitoneal do gangliosídeo GM1 sobre a atividade da catalase em cérebro de ratos.

## **2.2 Objetivos Específicos**

- Verificar qual é o tempo necessário para o GM1 agir sobre a atividade da catalase no estriado, hipocampo e córtex cerebral de ratos;
- Verificar o efeito do GM1 sobre a atividade da catalase sanguínea;
- Verificar se o aumento na atividade da catalásica induzido por GM1 se dá por aumento na quantidade de sangue retida nos capilares cerebrais;
- Verificar o efeito do GM1 sobre a atividade da catalase em fatias de córtex cerebral incubadas com GM1 em fluido cerebrospinal artificial aerado;
- Verificar o efeito da administração de GM1 sobre a espessura dos vasos sanguíneos cerebrais de ratos.

## **CAPÍTULO II**

---

### **3 ARTIGO**

**VASODILATION UNDERLIES THE INCREASE OF CATALASE  
ACTIVITY INDUCED BY GM1 GANGLIOSIDE  
IN THE BRAIN**

FURIAN, A.F., SCHNEIDER, M.O., ROYES, L.F.F., FIGHERA, M.R.,  
FIORENZA, N.G., MYSKIW, J.C., WEIBLEN, R., RUBIN, M.A.,  
FRUSSA-FILHO, R., MELLO, C.F.

**Submetido a Free Radical Biology & Medicine.**

# VASODILATION UNDERLIES THE INCREASE OF CATALASE ACTIVITY INDUCED BY GM1 GANGLIOSIDE IN THE BRAIN

Ana Flávia Furian<sup>1§</sup>, Mauro Schneider Oliveira<sup>1§</sup>,  
Luiz Fernando Freire Royes<sup>2</sup>, Michele Rechia Fighera<sup>1</sup>,  
Natália Gindri Fiorenza<sup>1</sup>, Jociane Carvalho Myskiw<sup>1</sup>, Rudi Weiblen<sup>3</sup>,  
Maribel Antonello Rubin<sup>4</sup>, Roberto Frussa-Filho<sup>5</sup>,  
Carlos Fernando Mello<sup>1\*</sup>

Departamento de <sup>1</sup>Fisiologia e Farmacologia, <sup>2</sup>Educação Física e Desportos,  
<sup>3</sup>Microbiologia e Parasitologia, <sup>4</sup>Química,  
Universidade Federal de Santa Maria,  
97105-900 Santa Maria, RS, Brasil

<sup>5</sup> Departamento de Farmacologia,  
Universidade Federal de São Paulo, 04023-062 São Paulo, SP, Brasil

§ both authors contributed equally to this study

Work supported by CNPq, FAPERGS

\*Corresponding author: Dr. Carlos Fernando Mello  
Departamento de Fisiologia e Farmacologia,  
Universidade Federal de Santa Maria  
97105-900 Santa Maria, RS, BRASIL.  
PHONE: +55 55 3220 9378  
FAX: +55 55 3220 8241  
e-mail: [cf.mello@smail.ufsm.br](mailto:cf.mello@smail.ufsm.br)

Running Title: GM1 Induces Vasodilation

# VASODILATION UNDERLIES THE INCREASE OF CATALASE ACTIVITY INDUCED BY GM1 GANGLIOSIDE IN THE BRAIN

## Abstract

Monosialoganglioside (GM1) is a glycosphingolipid present in most cell membranes that has antioxidant and neuroprotective properties. GM1 increases catalase activity in cerebral cortices *ex vivo*, but the mechanisms underlying this effect of GM1 are not known. In the current study we investigated the effect of GM1 (50 mg/kg, i.p.) on the content of hemoglobin and catalase activity of hippocampus, cortex and striatum of rats. GM1 administration increased catalase activity and hemoglobin content in brain samples, but had no effect on blood catalase activity. GM1-induced increase of catalase activity was abolished by transcardiac perfusion with heparinized saline. Brain catalase activity in the absence of erythrocytes, estimated by regression analysis of data from perfused and non-perfused animals, was not altered by the systemic injection of GM1. Moreover, the addition of GM1 (100 – 1000  $\mu$ M) did not increase catalase activity in slices of cerebral cortex *in vitro*, further suggesting that an intact vascular system is required for the facilitatory effect of GM1 on brain catalase activity. The vasodilatory effect of GM1 was confirmed *in vivo*, since the systemic injection of GM1 (50 mg/kg, i.p.) increased (1.5-2.5 times) the width of pial vessels.

**Key words:** antioxidant, GM1 ganglioside, neurodegenerative diseases, neuroprotection, catalase, vasodilation, hippocampus, cortex, striatum.

## Introduction

Gangliosides comprehend a group of glycosphingolipids that are components of most cell membranes. They are particularly abundant in the brain, where they represent the major lipid constituent of the neuronal surface [1]. Gangliosides are thought to play a modulatory role in different events associated with cell differentiation and oncogenic transformation [2, 3], adaptive responses [4, 5, 6, 7], memory formation [8-10] and synaptic plasticity [11, 12]. Monosialic acid ganglioside (GM1) protects the central nervous system against various neurotoxic agents or conditions, such as aspartic acid [13], MPTP [14], glutamic acid [15, 16], methylmalonic acid [16] and glutaric acid exposure [17], anoxia [18, 19] and ischemia [19], Parkinson's disease [20] and Alzheimer's disease [21], accompanied by an apparent absence of side effects.

The neurochemical mechanisms underlying GM1-induced neuroprotection are not completely known, but the wide range of situations in which GM1 is neuroprotective suggests that it may interact with common pathways involved in the development of cell injury, such as oxidative stress. In this line of view, there are studies showing that GM1 is an antioxidant, both *in vitro* and *in vivo* [22, 23]. Accordingly, GM1 inhibits methylmalonic acid-induced lipid peroxidation [16], glutaric acid-induced protein carbonylation [17], and may directly scavenge hydroxyl radicals and superoxide anions [24]. Further evidence for an antioxidant role for GM1 come from the studies that have demonstrated that systemic GM1 administration increases striatal ascorbic acid content [16] and catalase activity in cerebral cortex homogenates *ex vivo* [25]. It is particularly interesting that GM1-induced increase of catalase activity

depends on the integrity of the cerebral tissue, since it does not occur in homogenates *in vitro*. However, no study has addressed how GM1 increases cerebral catalase activity.

Catalase (EC 1.11.1.6) is an intracellular antioxidant enzyme that catalyzes the reaction of hydrogen peroxide to water and molecular oxygen, and plays a significant role in the development of tolerance to oxidative stress in vascular cells [26]. Catalase is particularly enriched in erythrocytes, where it metabolizes 90% of the hydrogen peroxide [27]. Due to its poor expression in the brain, catalase has been considered a secondary enzyme in controlling free radical-induced damage in this organ [28]. On the other hand, highly immunoreactive cells for catalase correspond to neurons known to be resistant to ischemia-reperfusion injury, whereas weakly stained cells correspond to neurons that are more susceptible to ischemic damage [29], indicating that catalase may be critical to protect against oxidative stress under pathological conditions. In this context, understanding the mechanisms underlying the GM1-elicited increase in catalase activity in the central nervous system could be useful in the development of new strategies for neuroprotection against oxidative stress. Therefore, in the present study we evaluated the effect of GM1 on cerebral catalase activity *ex vivo* and *in vitro*. Moreover, the effect of erythrocyte removal from blood vessels by transcatheter perfusion on cerebral catalase activity of control and GM1-treated animals was evaluated, in order to estimate the contribution of erythrocyte-derived catalase for the increase of catalase activity in the brain induced by the systemic injection of GM1. In addition, we investigated whether GM1 alters the content of hemoglobin in

cerebral samples (an index of erythrocyte content in cerebral vessels) and the width of pial vessels.

## **Experimental procedures**

### **Animals and reagents**

Adult male Wistar rats (270–300 g), maintained on a 12-h light/dark cycle (lights on at 7:00), with free access to tap water and standard laboratory chow (Guabi, Santa Maria, RS, Brazil) were used. All experimental protocols (including statistical evaluation) were designed aiming to keep the number of animals used to a minimum, as well as their suffering. The Ethics Committee for animal research of the Federal University of Santa Maria approved the experimental design. All reagents were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA) and respective solutions were prepared in type I ultra pure water. GM1 ganglioside was kindly donated by TRB Pharma Laboratories, São Paulo, Brazil.

### **Drug administration protocol and catalase activity**

The animals received either two injections of GM1 (50 mg/kg, i.p.) or saline (0.9 % NaCl, 1 ml/kg, i.p.), spaced 24 h apart. Thirty minutes after the second GM1 or saline injection, they were sacrificed by decapitation and their brains were rapidly removed. The hippocampi, cerebral cortices and striata were dissected on an inverted ice-cold Petri dish and homogenized 1:10 (w/v) in 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0). The homogenates were centrifuged at 27,000 *g* for 30 minutes at 4°C, and the supernatant was collected for posterior assay of catalase activity. Blood samples were collected immediately after the sacrifice into a heparinized tube. Catalase activity was

determined by following the decomposition of 30 mM hydrogen peroxide in 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0) at 240 nm for 120 s [30] in a thermostated (37°C) Hitachi U-2001 spectrophotometer. Catalase specific activity was expressed as first-order rate constant,  $k$ , per mg of protein [31]. Appropriate controls for non-enzymatic decomposition of hydrogen peroxide were included in the assays.

#### Hemoglobin content

The content of hemoglobin in brain and slice homogenates was spectrophotometrically estimated by the absorbance of the Soret band (405-435 nm, multiple wavelength scan), according to Henry, 1991 [32], in a Hitachi U-2001 double beam spectrophotometer (Hitachi Instruments Incorporation, Schaumburg, IL, USA).

#### Perfusion experiments

Animals were deeply anesthetized with Equitesin (1% pentobarbital, 2% magnesium sulfate, 4% chloral hydrate, 42% propylene glycol, 11% ethanol; 3 ml/kg, i.p.) and transcardiacally perfused with 100 ml of cold saline solution (0.9 % NaCl, containing 1 IU/ $\mu$ l of heparin). Anaesthetized (non-perfused) animals served as controls. After this procedure the brains were homogenized in phosphate buffer, and catalase activity was determined as described above.

#### Linear Regression Analysis

Catalase activity data from all experiments (including the experiments involving perfusion) were classified according to the presence or absence of

GM1 and plotted against hemoglobin content. We calculated the y-intercept of the two resulting regression lines [33], which represents the calculated nervous tissue catalase activity (in the absence of hemoglobin) for each cerebral structure.

#### *In vitro* experiments

Animals were sacrificed by decapitation and the cerebral cortex was immediately dissected and used for the preparation of slices (400  $\mu\text{m}$  thick) with a McIlwain tissue chopper. Slices were suspended in a pregassed (carbogen) artificial cerebrospinal fluid containing (in mM): 1.25  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; 22  $\text{NaH}_2\text{CO}_3$ ; 1.8  $\text{MgSO}_4$ ; 129.0  $\text{NaCl}$ ; 1.8  $\text{CaCl}_2$ ; 3.5  $\text{KCl}$ ; 10 D-glucose, and pH was adjusted to 7.4 with carbogen, and incubated for 30 min at 37°C without or with GM1 (100, 300 or 1000  $\mu\text{M}$ ). The concentrations of GM1 were chosen based on previous studies that have shown significant effects of GM1 on protein phosphorylation in striatal slices [34]. After incubation, slices were homogenized in 1 ml of 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0), centrifuged at 27,000  $g$  for 30 minutes at 4°C, and the supernatant was collected for catalase activity determination, as described above.

#### Width of cerebral vessels measurement

Animals were deeply anesthetized with Equitesin and had their right brain hemisphere exposed by removal of the right parietal bone. Care was taken to leave the dura mater intact, and the cranial window was continuously poured with sterile physiological saline. The animals were then injected with GM1 (50

mg/kg, i.p.) or equivalent volume of 0.9 % NaCl (1 ml/kg, i.p), and changes in width of pial vessels were monitored using a digital video camera coupled to a surface-contact objective (x 40), up to 30 minutes after drug administration. The state of circulation in cerebral vessels was estimated by the change in the width of pial vessels [35] along time, according Podoprigora et al., 2005 [36].

#### Protein determination

Protein content was measured colorimetrically by the method of Bradford [37], and bovine serum albumin (1 mg/ml) was used as standard.

#### Statistical analysis

Brain catalase activity *ex vivo* were analyzed by a 2 (NaCl or GM1, twenty-four hours before sacrifice) x 2 (NaCl or GM1, thirty minutes before sacrifice) x 3 (hippocampus, cortex or striatum) factorial ANOVA, with the cerebral structure treated as a within-subject factor. In those experiments involving perfusion, catalase activity was analyzed by a 2 (NaCl or GM1, thirty minutes before sacrifice) x 2 (perfusion or not) x 3 (hippocampus, cortex or striatum) factorial ANOVA, with the cerebral structure treated as a within-subject factor. Blood catalase activity was analyzed a two-way ANOVA. *Post hoc* analysis was carried out by the reverse Helmert contrast test, which compares levels of a factor with the mean of the subsequent levels of the factor. Variations in the width of pial vessels induced by GM1 were analyzed by a 2 treatments (NaCl or GM1) x 2 measures (before and after NaCl or GM1) ANOVA

considering the “measures” factor as a within-subject factor.  $P < 0.05$  was considered significant. All data are reported as mean + S.E.M.

## Results

Figure 1 shows the effect of two systemic injections of GM1 (24 hours and 30 min before sacrifice) on catalase activity in the hippocampus, cortex and striatum. Statistical analysis revealed a significant effect of treatment [0.9% NaCl or 50 mg/kg of GM1 30 min before sacrifice:  $F(1,33)=6.85$ ,  $P<0.02$ ] indicating that the second injection of GM1 (30 min before sacrifice) caused a general increase in catalase activity, and a significant effect of brain structures [ $F(2,66)=17.64$ ,  $P<0.001$ ]. *Post hoc* analysis (reverse Helmert contrast) revealed that the cerebral cortex had the highest catalase activity among the brain structures studied. Since the first injection of GM1 (24 hours before sacrifice) had no effect on hippocampal, cortical or striatal catalase activity [ $F(1,33)=0.10$ ,  $P=0.751$ ], the animals were injected only with a single dose of GM1 (50 mg/kg, i.p.) 30 minutes before sacrifice in subsequent experiments.

The effect of systemic GM1 administration on blood catalase activity was also evaluated (Table 1). Statistical analysis revealed that GM1 administration had no effect on blood catalase activity [ $F(1,33)=0.02$ ,  $P=0.881$ ]. Since systemic GM1 did not increase blood catalase activity we hypothesized that GM1 increases cerebral catalase activity by increasing the amount of erythrocytes retained in the cerebral tissue. We measured the absorbance of the Soret band of cerebral samples in order to assess the amount of hemoglobin (and, consequently, erythrocytes) retained in cerebral samples. Figure 2 shows the effect of a systemic injection of GM1 on the content of hemoglobin in cerebral

samples. Statistical analyses revealed a significant effect of treatment [0.9% NaCl or 50 mg/kg of GM1, i.p., 30 min before sacrifice:  $F(1,33)=10.33$ ,  $P<0.004$ ], because GM1 administration (30 minutes before sacrifice) increased significantly the content of hemoglobin in all cerebral structures; and a significant effect of brain structure [ $F(2,66)=56.65$ ,  $P<0.001$ ]. *Post hoc* analysis (reverse Helmert contrast) revealed that the content of hemoglobin in cortical and striatal samples were higher than in hippocampal samples.

In order to confirm whether GM1 increased catalase activity in the brain by increasing hemoglobin (erythrocyte) content, we investigated the effect of the perfusion of the brain with ice-cold heparinized isotonic saline on brain catalase activity of animals previously injected with saline or GM1. If GM1 increased catalase activity in the brain by retaining erythrocytes in cerebral tissue, perfusion should bring catalase activity and hemoglobin content to control levels. Figure 3 shows the effect of transcardiac cerebral perfusion with heparinized saline on GM1-induced increase of catalase activity in the hippocampus, cortex and striatum. Statistical analysis revealed a significant treatment (0.9% NaCl or 50 mg/kg GM1, 30 min before sacrifice) by transcardiac perfusion interaction [ $F(1,22)=8.48$ ,  $P=0.008$ ], indicating that perfusion reverted GM1-induced increase of catalase activity, regardless of the cerebral structure studied. Statistical analysis also revealed a highly significant perfusion by cerebral structure interaction [ $F(2,44)=20.22$ ,  $P<0.001$ ]. *Post hoc* analysis (reverse Helmert contrast) showed that the cerebral cortex had the highest catalase activity among the brain structures studied and, consequently, was the one which more intensely decreased catalase activity with perfusion.

Figure 4 shows the effect of perfusion on the content of hemoglobin in the three brain structures. Statistical analyses revealed a significant perfusion by brain structures interaction [ $F(2,44)=35.92$ ,  $P<0.001$ ]. In this case, similarly to the catalase activity, *post hoc* analysis (reverse Helmert contrast) revealed that the cerebral cortex had the highest hemoglobin content among the brain structures studied and, consequently, was the one which more intensely decreased the amount of hemoglobin with perfusion.

Further evidence of the involvement of vasodilation in the increase of catalase activity induced by GM1 in brain samples was obtained by determining a regression analysis of catalase activity in the brain against the respective area under the Soret band (hemoglobin content). The determined y-intercept for hippocampal, cortical and striatal samples in the absence or presence of GM1 were ( $k$  (1/ (min x mg of protein))  $\pm$  S.E.M.)  $0.172 \pm 0.055$  (NaCl) and  $0.201 \pm 0.003$  (GM1);  $0.131 \pm 0.052$  (NaCl) and  $0.096 \pm 0.040$  (GM1);  $0.134 \pm 0.045$  (NaCl) and  $0.122 \pm 0.036$  (GM1), respectively (Figure 5 A-C). Statistical analysis revealed no difference between GM1 and control values.

In order to avoid the vascular effect of GM1 *ex vivo* and investigate whether GM1 altered catalase activity *in vitro*, we investigated the effect of GM1 (100, 300 or 1000  $\mu$ M) on the catalase activity of slices from cerebral cortex of rats (Figure 6). The cerebral cortex was selected because this region presented the highest catalase activity among those studied in the *ex vivo* experiments. Interestingly, GM1 (1000  $\mu$ M) decreased catalase activity in slices from cerebral cortex [ $F(3,20)=3.26$ ,  $P=0.043$ ] compared to control group. The content of hemoglobin in cortical slices was also evaluated and, as expected, statistical

analysis revealed no significant effect of GM1 on the content of hemoglobin of the slices (data not shown).

Finally, in order to demonstrate that an effect of GM1 on microcirculation, we measured the width of pial vessels before and after the systemic injection of GM1 in anesthetized rats (Figure 7 A-B). The width of pial vessels increased 1.5-2.5 times 30 minutes after the administration of GM1, compared with baseline values [two-way ANOVA:  $F(1,2)=18.51$ ,  $P<0.05$ ]. The administration of 0.9% NaCl did not change the width of the pial vessels (data not shown).

## **Discussion**

In the current study we demonstrated that administration of GM1 thirty minutes before sacrifice increases catalase activity and the content of hemoglobin in hippocampal, cortical and striatal samples *ex vivo* (Figure 1, 2). We also showed that the removal of blood by transcardiac perfusion with heparinized saline abolishes the GM1-induced increase in brain catalase activity (Figure 3). Brain catalase activity in the absence of erythrocytes, estimated by regression analysis of data from perfused and non-perfused animals, was not altered by the systemic injection of GM1. (Figures 5A-C). These results further indicate that GM1 does not alter striatal, hippocampal or cortical catalase activity in the absence of erythrocytes, a finding that was confirmed by the lack of effect of GM1 on the catalase activity of cortical slices (in the absence of the vascular component - Figure 6). Finally, we showed that GM1 increased the width of pial vessels, confirming the data obtained with hemoglobin measures, and showing that vasodilation underlies the increase in catalase activity induced by GM1 in brain samples (Figure 7A-C).

Boveris & Chance [38], in a seminal work, were the first to envisage a role for erythrocyte catalase activity in the detoxification of hydrogen peroxide generated in brain cells. These authors have suggested that the hydrogen peroxide generated in brain cells might diffuse to local blood vessels and be metabolized by the abundant erythrocyte catalase. Since catalase activity in blood is several times higher than in brain tissue, the presence of erythrocytes in brain vessels could have a dramatic effect on total brain catalase activity. In fact, in this study we showed that removing the blood sequestered in brain vessels, before homogenizing the brain, decreases brain catalase activity in our samples to only 30% of non-perfused control values (Figure 3). Interestingly, the residual enzymatic catalase activity measured (without hemoglobin) in this study is similar to the activity measured in microglia-rich cultures [31], further suggesting that erythrocyte catalase significantly contributes to brain catalase activity in tissue homogenates.

The transcatheter perfusion with heparinized saline abolished the effect of GM1 on brain catalase activity (Figure 3), suggesting a role for erythrocytes in the GM1-induced increase of brain catalase activity. In this context, it has been shown that GM1 administration (30 mg/kg, i.v.) significantly restores local cerebral blood flow and glucose metabolism in animals subjected to arterial occlusion [39]. In fact, GM1 reduces brain edema and improves cerebral metabolism after traumatic brain injury [40], a finding that may be related to its ability to increase regional cerebral blood flow. In line with this view, GM1 improves neurological status and tends to increase cerebral blood flow in Alzheimer's diseased patients [41], further suggesting that vasodilation and better perfusion may underlie the neuroprotective actions of GM1. Therefore,

GM1 would provide not only the energetic substrates required for brain function, but also an additional antioxidant defense system to deal with the reactive species generated due to increased metabolic activity [42]. While the concept that a better perfusion reinforces tissue antioxidant systems by improving metabolic status is well established, in the current study we show that vasodilation significantly increases catalase activity in the brain tissue, providing a possible convergent mechanism for the neuroprotective actions of GM1. Consequently, our results may also explain why GM1 protects against various neurodegenerative conditions, such as anoxia [18, 19] ischemia [19], Parkinson [20] and Alzheimer's [21] diseases, in which there is a failure in brain antioxidant system and oxidative stress.

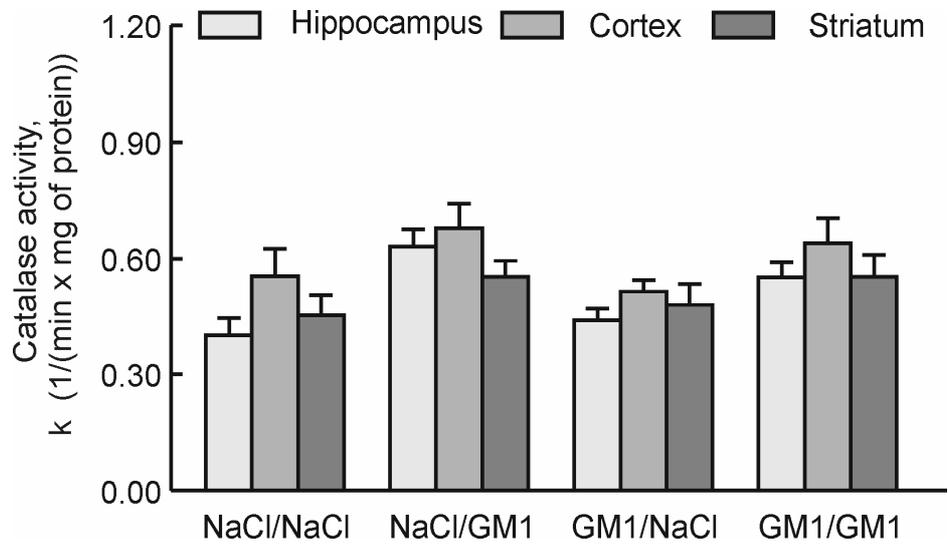
In summary, in this study we showed that vasodilation underlies the GM1-induced increase of catalase activity in brain homogenates. We suggest that erythrocyte catalase activity may play an important antioxidant role in the central nervous system, and that the adjunct therapy with GM1 may be of value in clinical conditions in which increased blood flow is associated to a better prognosis, such as obstructive vascular and neurodegenerative diseases.

## **Acknowledgements**

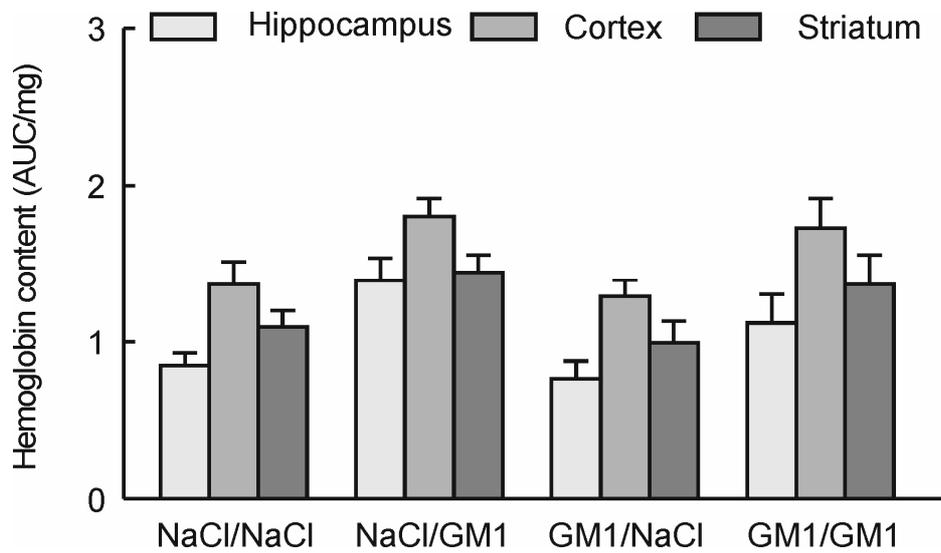
Research supported by CNPq (grant: 500120/2003-0). Carlos Fernando Mello, Ana Flávia Furian, Mauro Schneider Oliveira, Natália Gindri Fiorenza are the recipients of CNPq fellowships. The authors thank TRB Pharma, the Brazilian representative of Fidia Research Laboratories, for kindly donating GM1 ganglioside, Marcio Assolin Corrêa for expertise assistance with image analyses and Dr. João Batista Teixeira da Rocha for providing laboratory facilities.

**List of Abbreviations:** GM1, monosialic acid ganglioside; i.p., intraperitoneal; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, hydrogen peroxide; ANOVA, analysis of variance.

**Figure 1**



**Figure 2**

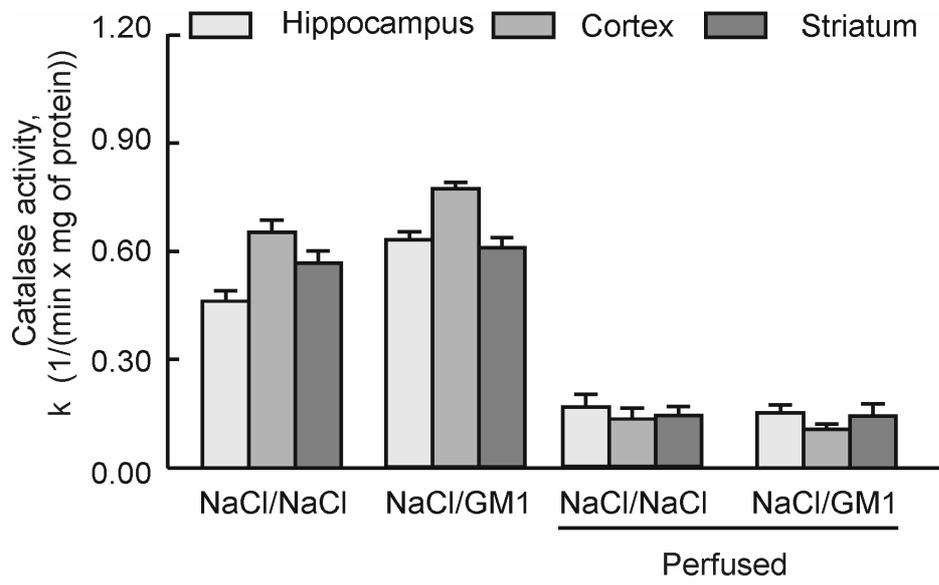


## Table 1

**Table 1:** Effect of GM1 (50 mg/kg, i.p.), injected 24 h or 30 min before sacrifice, on blood catalase activity. Data are mean  $\pm$  S.E.M. for n = 8-11 in each group.

| Group       | Catalase activity k (1/(min x mg of protein)) |
|-------------|---|
| NaCl - NaCl | 11.06 $\pm$ 1.541                             |
| NaCl - GM1  | 13.12 $\pm$ 2.061                             |
| GM1 - NaCl  | 10.19 $\pm$ 2.035                             |
| GM1 - GM1   | 12.94 $\pm$ 2.965                             |

**Figure 3**



**Figure 4**

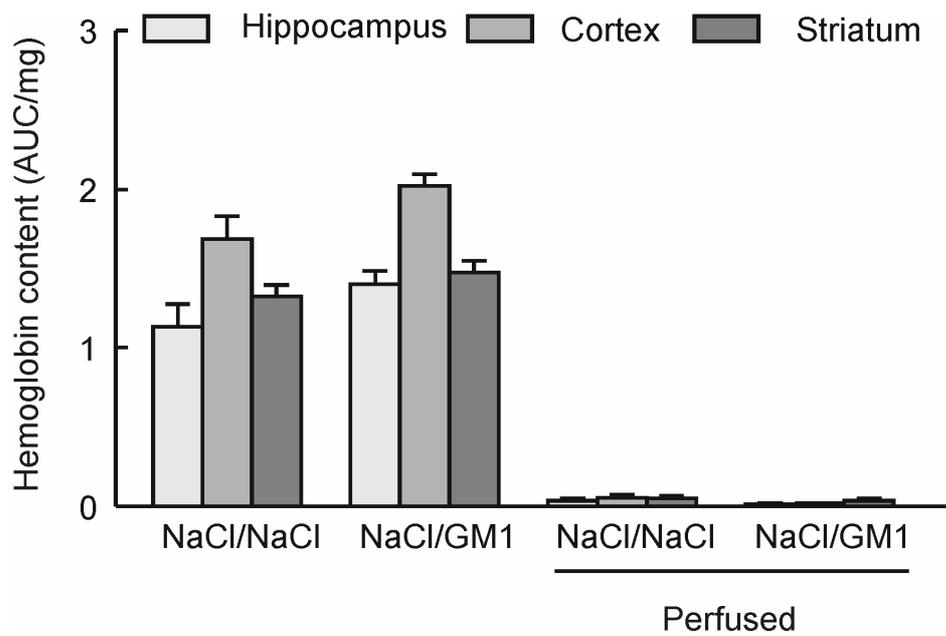


Figure 5 A - C

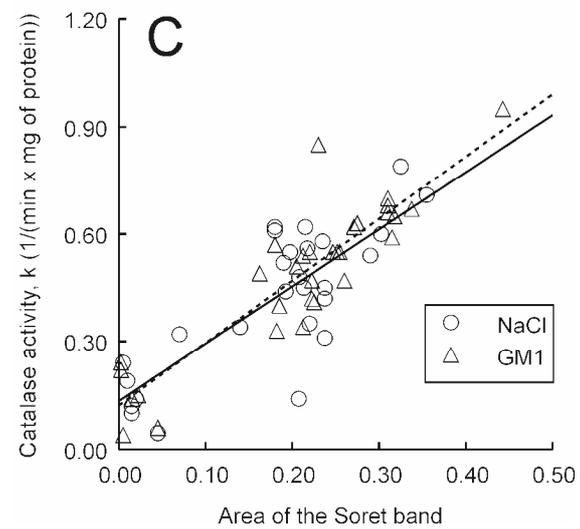
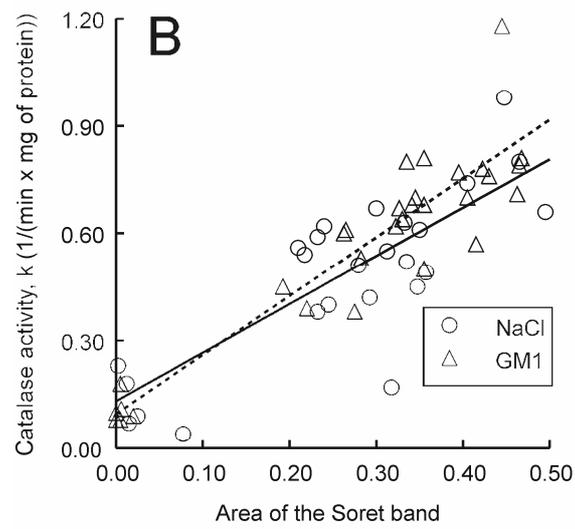
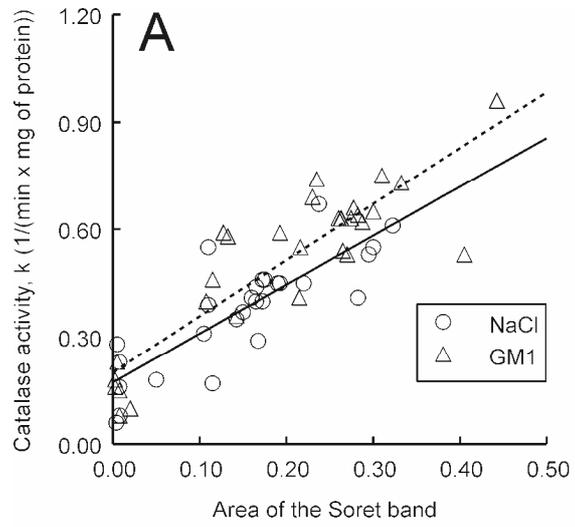


Figure 6

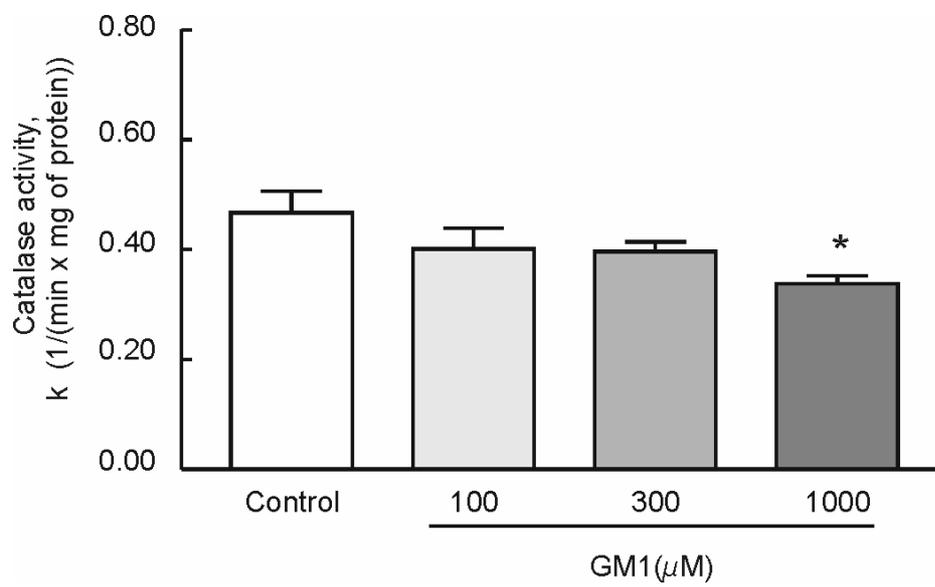
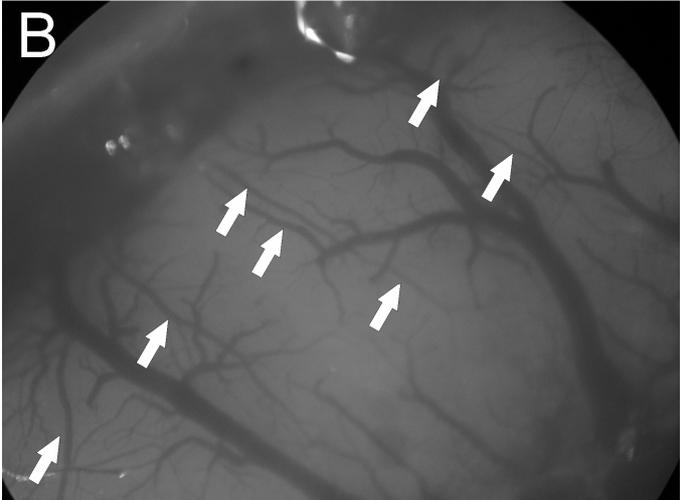
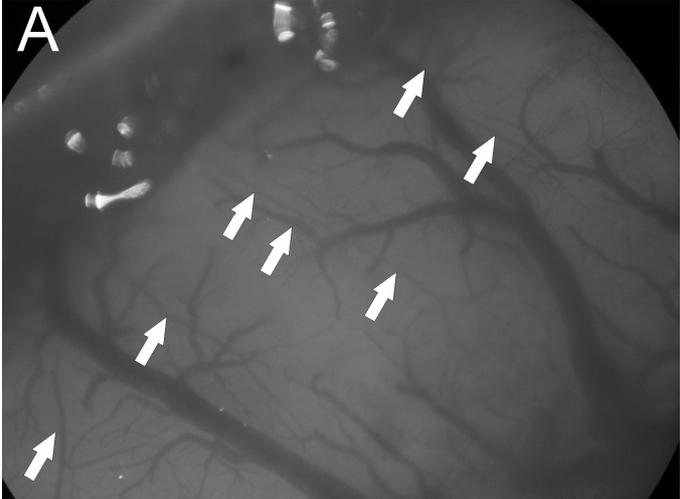


Figure 7 A – 7 B



## References

- [1] Ledeen, R. W.; Yu, R. K. Gangliosides: structure, isolation, and analysis. *Methods Enzymol* **83**:139-191; 1982.
- [2] Schengrund, C. L. The role(s) of gangliosides in neural differentiation and repair: a perspective. *Brain Res Bull* **24**:131-141; 1990.
- [3] Zeller, C. B.; Marchase, R. B. Gangliosides as modulators of cell function. *Am J Physiol* **262**:C1341-1355; 1992.
- [4] Vital, M. A.; Frussa-Filho, R.; Palermo-Neto, J. Effects of monosialoganglioside on dopaminergic supersensitivity. *Life Sci* **56**:2299-2307; 1995.
- [5] Bellot, R. G.; Camarini, R.; Vital, M. A.; Palermo-Neto, J.; Leyton, V.; Frussa-Filho, R. Monosialoganglioside attenuates the excitatory and behavioural sensitization effects of ethanol. *Eur J Pharmacol* **313**:175-179; 1996.
- [6] Bellot, R. G.; Vital, M. A.; Palermo-Neto, J.; Frussa-Filho, R. Repeated monosialoganglioside administration attenuates behavioral sensitization to amphetamine. *Brain Res* **747**:169-172; 1997.
- [7] Perry, J. C.; Vital, M. A.; Frussa-Filho, R.; Tufik, S.; Palermo-Neto, J. Monosialoganglioside (GM1) attenuates the behavioural effects of long-term haloperidol administration in supersensitive rats. *Eur Neuropsychopharmacol* **14**:127-133; 2004.
- [8] Rahmann, H. Brain gangliosides and memory formation. *Behav Brain Res* **66**:105-116; 1995.

- [9] Silva, R. H.; Felicio, L. F.; Nasello, A. G.; Vital, M. A.; Frussa-Filho, R. Effect of ganglioside (GM1) on memory in senescent rats. *Neurobiol Aging* **17**:583-586; 1996.
- [10] Fong, T. G.; Neff, N. H.; Hadjiconstantinou, M. GM1 ganglioside improves spatial learning and memory of aged rats. *Behav Brain Res* **85**:203-211; 1997.
- [11] Wieraszko, A.; Seifert, W. The role of monosialoganglioside GM1 in the synaptic plasticity: in vitro study on rat hippocampal slices. *Brain Res* **345**:159-164; 1985.
- [12] Vital, M. A.; Florio, J. C.; Frussa-Filho, R.; De Lucia, R.; Tufik, S.; Palermo-Neto, J. Effects of haloperidol and GM1 ganglioside treatment on striatal D2 receptor binding and dopamine turnover. *Life Sci* **62**:1161-1169; 1998.
- [13] Skaper, S. D.; Facci, L.; Leon, A. Gangliosides attenuate the delayed neurotoxicity of aspartic acid in vitro. *Neurosci Lett* **117**:154-159; 1990.
- [14] Rothblat, D. S.; Schneider, J. S. Spontaneous functional recovery from parkinsonism is not due to reinnervation of the dorsal striatum by residual dopaminergic neurons. *Brain Res Bull* **34**:309-312; 1994.
- [15] Vorwerk, C. K.; Gorla, M. S.; Dreyer, E. B. An experimental basis for implicating excitotoxicity in glaucomatous optic neuropathy. *Surv Ophthalmol* **43 Suppl 1**:S142-150; 1999.
- [16] Figuera, M. R.; Bonini, J. S.; de Oliveira, T. G.; Frussa-Filho, R.; Rocha, J. B.; Dutra-Filho, C. S.; Rubin, M. A.; Mello, C. F. GM1 ganglioside attenuates convulsions and thiobarbituric acid reactive substances production induced by

the intrastriatal injection of methylmalonic acid. *Int J Biochem Cell Biol* **35**:465-473; 2003.

[17] Fighera, M. R.; Royes, L. F.; Furian, A. F.; Oliveira, M. S.; Fiorenza, N. G.; Frussa-Filho, R.; Petry, J. C.; Coelho, R. C.; Mello, C. F. GM1 ganglioside prevents seizures, Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity inhibition and oxidative stress induced by glutaric acid and pentylene-tetrazole. *Neurobiol Dis* **22**:611-623; 2006.

[18] Tan, W. K.; Williams, C. E.; Gunn, A. J.; Mallard, E. C.; Gluckman, P. D. Pretreatment with monosialoganglioside GM1 protects the brain of fetal sheep against hypoxic-ischemic injury without causing systemic compromise. *Pediatr Res* **34**:18-22; 1993.

[19] Carolei, A.; Fieschi, C.; Bruno, R.; Toffano, G. Monosialoganglioside GM1 in cerebral ischemia. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* **3**:134-157; 1991.

[20] Schneider, J. S. GM1 ganglioside in the treatment of Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci* **845**:363-373; 1998.

[21] Svennerholm, L. Gangliosides--a new therapeutic agent against stroke and Alzheimer's disease. *Life Sci* **55**:2125-2134; 1994.

[22] Avrova, N. F.; Tyurin, V. A.; Tyurina, Y.; Kagan, V. E. Gangliosides in postischemic cellular dysfunctions. *Ann N Y Acad Sci* **723**:353-355; 1994.

[23] Avrova, N. F.; Victorov, I. V.; Tyurin, V. A.; Zakharova, I. O.; Sokolova, T. V.; Andreeva, N. A.; Stelmaschuk, E. V.; Tyurina, Y. Y.; Gonchar, V. S. Inhibition of glutamate-induced intensification of free radical reactions by gangliosides: possible role in their protective effect in rat cerebellar granule cells and brain synaptosomes. *Neurochem Res* **23**:945-952; 1998.

- [24] Maulik, N.; Das, D. K.; Gogineni, M.; Cordis, G. A.; Avrova, N.; Denisova, N. Reduction of myocardial ischemic reperfusion injury by sialylated glycosphingolipids, gangliosides. *J Cardiovasc Pharmacol* **22**:74-81; 1993.
- [25] Figuera, M. R.; Bonini, J. S.; Frussa-Filho, R.; Dutra-Filho, C. S.; Hagen, M. E.; Rubin, M. A.; Mello, C. F. Monosialoganglioside increases catalase activity in cerebral cortex of rats. *Free Radic Res* **38**:495-500; 2004.
- [26] Wassmann, S.; Wassmann, K.; Nickenig, G. Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. *Hypertension* **44**:381-386; 2004.
- [27] Mueller, S.; Riedel, H. D.; Stremmel, W. Direct evidence for catalase as the predominant H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-removing enzyme in human erythrocytes. *Blood* **90**:4973-4978; 1997.
- [28] Reiter, R. J. Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. *Faseb J* **9**:526-533; 1995.
- [29] Moreno, S.; Mugnaini, E.; Ceru, M. P. Immunocytochemical localization of catalase in the central nervous system of the rat. *J Histochem Cytochem* **43**:1253-1267; 1995.
- [30] Aebi, H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* **105**:121-126; 1984.
- [31] Hirrlinger, J.; Resch, A.; Gutterer, J. M.; Dringen, R. Oligodendroglial cells in culture effectively dispose of exogenous hydrogen peroxide: comparison with cultured neurones, astroglial and microglial cells. *J Neurochem* **82**:635-644; 2002.
- [32] Henry, J. *Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*. Philadelphia: W.B. Saunders Co.; 1991.

- [33] Tallarida, R.; Murray, R. *Manual of Pharmacologic Calculations With Computer Programs*. New York: Springer-Verlag; 1987.
- [34] Duchemin, A. M.; Ren, Q.; Mo, L.; Neff, N. H.; Hadjiconstantinou, M. GM1 ganglioside induces phosphorylation and activation of Trk and Erk in brain. *J Neurochem* **81**:696-707; 2002.
- [35] Sobey, C. G.; Quan, L. L. Impaired cerebral vasodilator responses to NO and PDE V inhibition after subarachnoid hemorrhage. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **277**:H1718-H1724; 1999.
- [36] Podoprigora, G. I.; Nartsissov, Y. R.; Aleksandrov, P. N. Effect of glycine on microcirculation in pial vessels of rat brain. *Bull Exp Biol Med* **139**:675-677; 2005.
- [37] Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**:248-254; 1976.
- [38] Boveris, A.; Chance, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J* **134**:707-716; 1973.
- [39] Tanaka, K.; Dora, E.; Urbanics, R.; Greenberg, J. H.; Toffano, G.; Reivich, M. Effect of the ganglioside GM1, on cerebral metabolism, microcirculation, recovery kinetics of ECoG and histology, during the recovery period following focal ischemia in cats. *Stroke* **17**:1170-1178; 1986.
- [40] Chen, Z. G.; Lu, Y. C.; Zhu, C.; Zhang, G. J.; Ding, X. H.; Jiang, J. Y. Effects of ganglioside GM1 on reduction of brain edema and amelioration of cerebral metabolism after traumatic brain injury. *Chin J Traumatol* **6**:23-27; 2003.

- [41] Svennerholm, L.; Brane, G.; Karlsson, I.; Lekman, A.; Ramstrom, I.; Wikkelso, C. Alzheimer disease - effect of continuous intracerebroventricular treatment with GM1 ganglioside and a systematic activation programme. *Dement Geriatr Cogn Disord* **14**:128-136; 2002.
- [42] Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol* **186**:1-85; 1990.

### **Figure legends**

**Figure 1:** Effect of GM1 (50 mg/kg, i.p.), injected 24 h or 30 min before sacrifice, on catalase activity in hippocampus, cortex and striatum *ex vivo*. Data are mean + S.E.M. for n = 8-11 in each group.

**Figure 2:** Effect of GM1 (50 mg/kg, i.p.), injected 24 h or 30 min before sacrifice, on the content of hemoglobin in hippocampus, cortex and striatum *ex vivo*. Data are mean + S.E.M. for n = 8-11 in each group.

**Figure 3:** Effect of GM1 (50 mg/kg, i.p.), injected 30 min before sacrifice, on catalase activity in hippocampus, cortex and striatum in perfused and non-perfused animals *ex vivo*. Data are mean + S.E.M. for n = 6-7 in each group.

**Figure 4:** Effect of GM1 (50 mg/kg, i.p.), injected 30 min before sacrifice, on the content of hemoglobin in hippocampus, cortex and striatum in perfused and non-perfused animals *ex vivo*. Data are mean + S.E.M. for n = 6-7 in each group.

**Figure 5:** Regression analysis of catalase activity in the brain against the respective area under the Soret band (content of hemoglobin), in hippocampus (5A), cortex (5B) and striatum (5C), in animals previously injected with NaCl (solid line, 30 animals) or GM1 (50 mg/kg, i.p., dotted line, 33 animals).

**Figure 6:** Effect of GM1 (100, 300 or 1000  $\mu$ M) on catalase activity *in vitro*. Data are mean + S.E.M. for n = 6 in each group. \*Indicates a significant difference ( $P=0.043$ ) compared with the control group.

**Figure 7:** GM1 increases the width of pial vessels. Baseline pial vessels width (7A) and 30 minutes after administration of GM1 (50 mg/kg, i.p., 7B). Arrows indicate vasodilated pial vessels, compared to baseline (x 40), n= 2.

## **CAPÍTULO III**

---

## **4 DISCUSSÃO**

#### 4. Discussão

A utilização clínica de gangliosídeos exógenos, especialmente do monossialogangliosídeo, tem sido proposta para várias patologias do sistema nervoso, como lesão de medula espinhal (Mahadik & Karpiak, 1988; Geisler et al., 1991), neuropatias periféricas (Schneider et al., 1994), doenças cérebro-vasculares (Carolei et al., 1991), isquemia (Lazzaro et al., 1994), hipóxia (Krajnc et al., 1994), doença de Parkinson (Schneider et al., 1998), Alzheimer (Svennerholm et al., 2002) e traumatismo crânio-encefálico (Chen et al., 2003). Essa diversidade de aplicações clínicas provavelmente esteja relacionada à considerável variedade de mecanismos de ação e de efeitos farmacológicos promovidos por este glicosídeo. Assim sendo, é possível que o gangliosídeo GM1 atue em uma via comum a várias condições/doenças, por exemplo, o estresse oxidativo. Nessa linha de raciocínio, tem sido sugerido que este gangliosídeo cause neuroproteção devido à sua ação antioxidante, tanto *in vivo* (Fighera et al., 2003; 2004; 2006) como *in vitro* (Maulik et al., 1993; Avrova et al., 1994; 2002). De fato, o GM1 inibe a liperoxidação e protege receptores e enzimas, como a Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase, contra o dano oxidativo induzido pela isquemia (Mahadik et al., 1989) e por glutamato (Avrova et al., 2002). Entretanto, os mecanismos pelos quais o GM1 exerce seu efeito antioxidante ainda não estão completamente esclarecidos, e foi sugerido que ele tem atividade antioxidante direta, já que é capaz de neutralizar a ação dos radicais hidroxila e superóxido, induzidos por isquemia em coração de ratos *in vitro* (Maulik et al., 1993). Neste contexto, Mahadik e colaboradores (1993) observaram que a administração de GM1 (10 mg/kg, i.m.) aumenta os níveis de enzimas antioxidantes, catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase, após uma lesão isquêmica no córtex. Estudos do nosso grupo mostraram que a administração sistêmica de GM1 diminui as convulsões e a liperoxidação induzidas por metilmalonato (Fighera et al.,

2003), a lipoperoxidação e carbonilação protéica induzidas por ácido glutárico e pentilenotetrazol (Fighera et al., 2006), bem como aumenta o conteúdo de ácido ascórbico estriatal (Fighera et al., 2003). Interessantemente, essa mesma dose de GM1 aumentou a atividade catalásica cerebral e reduziu a quimioluminescência no córtex cerebral *ex vivo* (Fighera et al., 2004). No entanto, em homogeneizado de córtex *in vitro* o GM1 reduziu a atividade catalásica e não causou efeito significativo sobre a quimioluminescência (Fighera et al., 2003; 2004), mostrando que o GM1 não tem atividade antioxidante intrínseca no nosso modelo. Contudo, o mecanismo pelo qual o GM1 aumenta a atividade da catalase, assim como seu efeito em outras estruturas cerebrais não está esclarecido.

A catalase (EC 1.11.1.6; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidoreductase) é uma proteína homotetramérica que contém um grupo heme (Chance et al., 1979), capaz de decompor o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular (Oshino et al., 1973). A CAT se encontra fundamentalmente nos peroxissomos, onde remove o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, gerado pela β-oxidação dos ácidos graxos ou na oxidação dos alcanos, e sua atividade catalítica é o principal processo que regula os níveis intracelulares de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Gaetani, 1989).

O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> não é um radical livre por si só, mas em altas concentrações pode reagir com o superóxido (reação de Haber-Weiss) ou com o ferro na reação de Fenton formando o radical hidroxila que é altamente reativo (Halliwell, 2001). A catalase, além de remover o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, também tem papel relevante na detoxificação indireta do radical superóxido, que é convertido em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pela superóxido dismutase, e então decomposto pela catalase (Wassmann et al., 2004). A catalase é uma enzima crítica na defesa das células aeróbicas contra o estresse oxidativo. A diminuição da atividade desta enzima no cérebro pode contribuir para a vulnerabilidade neuronal (Moreno et al., 1995), e tem sido descrito que, apesar da baixa atividade desta enzima no SNC, inibidores da catalase

umentam a toxicidade do oxigênio no SNC de ratos (Huckman, 1993; Zhang & Piantadosi, 1991). Além disso, a administração de catalase, sozinha, ou em combinação com superóxido dismutase protege áreas cerebrais específicas como córtex, estriado, hipocampo e tálamo da injúria neuronal induzida por isquemia (Liu et al., 1989; Matsuyama et al., 1994).

Como o sistema nervoso central é especialmente vulnerável à isquemia e a neurotoxicidade induzida por inibidores metabólicos e radicais livres, nosso objetivo foi investigar o mecanismo de ação do GM1 sobre a atividade da catalase, no hipocampo, no córtex cerebral, no estriado e no sangue de ratos, visto que um aumento na atividade desta enzima pode constituir uma nova estratégia no desenvolvimento de tratamentos de diversas patologias nas quais o estresse oxidativo tem papel importante.

Neste trabalho, nós verificamos que a administração de GM1 (50mg/kg, i.p.) 30 minutos antes do sacrifício aumentou a atividade da catalase nas estruturas cerebrais estudadas (Figura 1, artigo). Não houve efeito da primeira injeção (24 horas antes do sacrifício) de GM1 sobre o aumento da atividade da catalase. A atividade da catalase no sangue também foi analisada, e não foi diferente entre os grupos tratados com GM1 ou NaCl 0,9% (Tabela 1, artigo).

Boveris & Chance (1973) sugeriram que a catalase eritrocitária está envolvida na detoxificação do  $H_2O_2$  gerado nas células cerebrais. Desta forma, o  $H_2O_2$  gerado no SNC difundiria para os vasos sanguíneos e seria detoxificado pela abundante catalase eritrocitária. A catalase é a enzima responsável pela detoxificação de cerca de 90% do  $H_2O_2$  no sangue, e sua atividade é maior em relação aos outros tecidos (Mueller, 1997). Como o GM1 não alterou a atividade catalásica no sangue, decidimos investigar se o aumento da atividade catalásica cerebral era devido ao aumento de sangue retido nos vasos sanguíneos cerebrais. Para isso, medimos a área da banda de Soretto nas amostras

cerebrais para quantificar o conteúdo de hemoglobina e assim, a quantidade de eritrócitos nas amostras. Verificamos que a administração de GM1 aumentou a quantidade de hemoglobina nas amostras cerebrais (Figura 2, artigo), fornecendo um possível mecanismo para o efeito do GM1 sobre a atividade catalásica no SNC. Tendo em vista a possível contribuição dos eritrócitos retidos nos vasos sanguíneos cerebrais para aumentar a atividade catalásica no SNC por GM1, nós estudamos o efeito da perfusão transcardíaca sobre o aumento da atividade catalásica induzida por GM1. A perfusão teve por finalidade remover os eritrócitos do hipocampo, córtex cerebral e estriado. Se o GM1 aumentasse a atividade catalásica cerebral por aumentar a quantidade de eritrócitos, tal aumento deveria ser abolido pela perfusão prévia do tecido. A perfusão transcardíaca aboliu o aumento da atividade catalásica induzida por GM1 (Figura 3, artigo), causando uma redução de 70% na atividade catalásica, em relação aos animais não perfundidos. De forma semelhante, o conteúdo de hemoglobina foi drasticamente reduzido pela perfusão, assim como foi abolido o efeito do GM1 de aumentar o conteúdo de hemoglobina (Figura 4, artigo). Os valores de atividade da catalase cerebral encontrados nas estruturas perfundidas são semelhantes aos valores encontrados em cultura de células (Hirrlinger, 2002), fornecendo mais uma evidência da importância do componente vascular no aumento da atividade da catalase.

Sabendo do envolvimento da catalase eritrocitária no aumento da atividade da catalase cerebral causada pelo GM1, nós fizemos uma análise de regressão linear da atividade catalásica versus a quantidade de hemoglobina dos animais perfundidos e não perfundidos, tratados com GM1 ou NaCl 0,9% (Figura 5A-C, artigo). A regressão foi realizada em cada estrutura cerebral, sendo que o valor de intercepto no eixo y corresponde à atividade da catalase cerebral estimada para a ausência de hemoglobina.

O GM1 não alterou a atividade tecidual mostrando, novamente, a dependência da atividade da catalase do eritrócito para o seu efeito.

Interessantemente, o GM1 não aumentou a atividade catalásica nas fatias de córtex cerebral (“slices”) (Figura 6, artigo), confirmando que este gangliosídeo necessita do sistema vascular intacto para exercer seus efeitos. Como esperado, a quantidade de hemoglobina nas fatias de córtex cerebral não foi alterada por GM1 (dados não mostrados). Além disso, a maior concentração testada de GM1 (1000  $\mu$ M) diminuiu a atividade catalásica em relação ao grupo controle (sem GM1) em fatias de córtex cerebral. Estudos anteriores já reportaram um efeito inibitório semelhante sobre a fosforilação da ERK (Duchemin, 2002), pois altas concentrações de GM1 podem formar agregados ou micelas que dificultam sua ação (Saqr, 1993). Como esta mesma concentração inibiu cascatas de fosforilação, poderia também diminuir a atividade da catalase visto que esta enzima também é controlada por cascatas de fosforilação mediadas pelas quinases c-Abl e Arg (Cao et al., 2003a) por um mecanismo que não esteja relacionado à formação de micelas. Resultados anteriores do nosso grupo mostraram que, embora o GM1 tenha reduzido a quimiluminescência e aumentado a atividade da CAT *ex vivo*, ele não alterou a quimiluminescência e também diminuiu a atividade catalásica nas maiores concentrações *in vitro* ( $10^3 - 10^4$  nM).

No intuito de confirmar o efeito vasodilatador do GM1, nós medimos a espessura dos vasos sanguíneos cerebrais 30 minutos após a sua administração sistêmica. Foi observado que o GM1 (50mg/kg, i.p.) causou vasodilatação, aumentando em 1,5 a 2,5 vezes a espessura dos vasos sanguíneos cerebrais (Figura 7B), comparando com a espessura basal (Figura 7A). A administração de NaCl 0,9%, não alterou a espessura dos vasos sanguíneos (dados não mostrados).

Neste contexto foi mostrado que a administração de GM1 (30 mg/kg, i.v.) restaura o fluxo sanguíneo cerebral e o metabolismo da glicose em um modelo de isquemia focal. De fato, o GM1 reduz o edema e melhora o metabolismo cerebral após traumatismo crânio-encefálico (Chen et al., 2003), o que pode ser relacionado à sua habilidade de aumentar o fluxo sanguíneo cerebral. Além disso, foi mostrado que o GM1 melhora os parâmetros neurológicos e cognitivos, e tende a provocar um aumento do fluxo cerebral em pacientes com doença de Alzheimer (Svenerholm, 2002), sugerindo que a vasodilatação e uma melhor perfusão podem ser responsáveis pelos efeitos neuroprotetores do GM1.

O mecanismo pelo qual o GM1 causa vasodilatação pode ser resultante da ativação da enzima óxido nítrico sintase endotelial, uma enzima importante no controle da vasodilatação. Neste contexto, foi visto que o GM1 induz a ativação de receptores TrkC (Rabin et al., 2002, Duchemin et al., 2002), e a ativação destes receptores provoca um aumento na produção de óxido nítrico em células do endotélio cerebral (Takeo et al., 2003). Outra possível explicação para o efeito vasodilatador do GM1 pode ser seu efeito sobre a atividade das fosfodiesterases. Higashi e colaboradores (1992) sugeriram que os gangliosídeos modulam enzimas dependentes de cálcio-calmodulina, como a fosfodiesterase de nucleotídeos cíclicos. Sabe-se que a inibidores desta enzima induzem o relaxamento de artérias cerebrais isoladas. Sendo assim, o GM1 não fornece só os substratos energéticos requeridos para a função cerebral, mas também um sistema de defesa antioxidante adicional, necessário para neutralizar as espécies reativas formadas em decorrência de uma atividade metabólica aumentada (Halliwell e Gutteridge, 1990). Embora o conceito de que uma melhor perfusão reforça o sistema antioxidante por melhorar o estado metabólico esteja bem estabelecido, neste estudo nós mostramos que a vasodilatação aumenta significativamente a atividade da catalase no cérebro,

fornecendo um mecanismo adicional e convergente para o efeito neuroprotetor do GM1. Conseqüentemente, nossos resultados também podem explicar como o GM1 protege contra várias doenças neurodegenerativas como Parkinson, Alzheimer, anóxia e isquemia, onde há uma falência no sistema antioxidante cerebral e estresse oxidativo.

Finalmente, neste estudo mostramos que o GM1 causa vasodilatação, e que é este o mecanismo pelo qual aumenta a atividade catalásica nas amostras cerebrais. Sugerimos, também, que a catalase eritrocitária pode ter papel antioxidante importante no sistema nervoso central, e que uma terapia adjunta com GM1 poderia ser útil em condições clínicas nas quais o aumento do fluxo sanguíneo é associado a um melhor prognóstico, como em doenças vasculares obstrutivas e doenças neurodegenerativas.

Além disso, nós sugerimos que os trabalhos que tem por objetivo estudar o efeito de determinada substância sobre a atividade da catalase tecidual, realizem a perfusão transcardíaca para evitar a influência da catalase eritrocitária, visto que ela representa a principal enzima detoxificadora de  $H_2O_2$  no sangue.

---

## **5 CONCLUSÕES**

## 5. Conclusões

De acordo com os resultados obtidos pode-se concluir que:

- A segunda injeção de GM1 (30 minutos antes do sacrifício), foi eficaz em aumentar a atividade da catalase no hipocampo, córtex cerebral e estriado de ratos, e a administração sequencial de GM1 não resultou em efeito aditivo;

- A atividade da catalase sanguínea não foi alterada pela administração de GM1;

- A atividade da catalase cerebral aumenta com o aumento da quantidade de eritrócitos contidos nos capilares cerebrais, pois a perfusão aboliu o efeito do GM1;

- O GM1 não aumentou a atividade da catalase em fatias de córtex cerebral incubadas com fluido cerebrospinal artificial aerado, e a concentração de 1000  $\mu\text{M}$  causou uma redução na atividade;

- A administração de GM1 aumentou a espessura dos vasos sanguíneos cerebrais (1,5 a 2,5 vezes) de ratos em relação ao estado basal;

---

## **6 REFERÊNCIAS**

## 6. Referências

1. Albertson, T.E. & Walby, W.F. (1987) The effect of exogenous GM1 ganglioside on kindled-amygdaloid seizures. *Neuropharmacology* 26: 261-264.
2. Ando, S. (1997) Gangliosides and related sialyl compounds as modulators of synaptic functions. In: *Sphingolipids as signaling modulators in the nervous system*, p. 33, 1997.
3. Ando, S., Chang, N.C., Yu, R.K. (1978) High-performance thin-layer chromatography and densitometric of brain ganglioside composition of several species. *Analytical Biochemistry*, 89: 437-450.
4. Andrasi, E., Farkas, E., Gawlik, D., Rosick, U., Bratter, P. (2000) Brain Iron and Zinc Contents of German Patients with Alzheimer Disease. *Journal of Alzheimers Disease* 2:17-26.
5. Avrova, N.F., Zakharova, I.O., Tyurin, V.A., Tyurina, YuYu, Gamaley, I.A., Schepetkin, I.A. (2002) Different metabolic effects of gangliosídeo GM1 in brain synaptosomes and phagocytic cells. *Neurochemical Research* 27:751-759.
6. Avrova, N.F., Tyurin, V.A., Tyurina, YuYu, Kagan, V.E. (1994) Gangliosides in postischemic cellular dysfunctions. *Annals of the New York Academy of Sciences* 723:353-355.
7. Ballough, G.P., Cann, F.J., Smith, C.D., Forster, J.S., Kling, C.E., Filbert, M.G. (1998) GM1 monosialoganglioside pretreatment protects against soman-induced seizure-related brain damage. *Molecular and Chemical Neuropathology* 34:1-23.
8. Bergendi, L., Benes, L., Durackova, Z., Ferencik, M.. (1999) Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sciences* 65:1865-1874.

9. Boveris, A. & Chance, B. (1973) The mitochondrial generation of hydrogen peroxide: general properties and effect of hyperbaric oxygen. *Journal of Biochemistry* 134: 707-716.
10. Cao, C., Leng, Y., Liu, X., Yi, Y., Li, P., Kufe, D. (2003a) Catalase is regulated by ubiquitination and proteosomal degradation. Role of the c-Abl and Arg tyrosine kinases. *Biochemistry* 42:10348-10353.
11. Cao, C., Leng, Y., Kufe, D. (2003b) Catalase activity is regulated by c-Abl and Arg in the oxidative stress response. *Journal of Biological Chemistry* 278:29667-29675.
12. Cao, G., Sofic, E., Pryor, R. L. (1997) Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radicals Biology & Medicine* 22:749-760.
13. Carolei, A., Fieschi, C., Bruno, R., Toffano, G. (1991) Monosialoganglioside GM1 in cerebral ischemia. *Cerebrovascular and Brain Metabolism Reviews* 3(2): 134-157.
14. Chance, B., Sies, H., Boveris, A. (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological Reviews* 59: 527 – 605.
15. Chen, Z. G., Lu, Y. C., Zhu, C., Zhang, G. J., Ding, X. H., Jiang, J. Y. (2003) Effects of ganglioside GM1 on reduction of brain edema and amelioration of cerebral metabolism after traumatic brain injury. *Chinese Journal of Traumatology* 6(1): 23-27.
16. Costa, E., Armstrong, D., Guidotti, A., Kharlamov, A., Kiedrowski, I., Wroblewski, J.T. (1993) Ganglioside GM1 and its semisynthetic analogues reduce glutamate neurotoxicity by a novel mechanism. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 341:129-141.
17. Dal Toso, R., Skaper, S.D., Ferrari, G. (1988) Ganglioside involvement in membrane-mediated transfer of Trophic information: relationship to GM1 effects

following CNS injury. In: Stein, D.G.; Sabel B.A. (eds.), *Pharmacological Approaches to the Treatment of Brain and Spinal Cord Injury*, p. 143-165, Plenum, New York, 1988.

18. Del Maestro, R.F. (1980) An approach and to free radicals in medicine and biology. *Acta Physiologica Scandinavica Supplementum*, 492:153-167.

19. Derry, D.M. & Wolf, L.S. (1967) Gangliosides in isolated neurons and glial cells. *Science* 158:1450-1452.

20. Dröge, W. (2002) Free radicals in the physiological control of cells function. *Physiological Reviews* 82:47-95.

21. Duchemin, A.M., Neff, N. H., Hadjiconstantinou, M. (1997) GM1 increases the content and RNAm of NGF in the brain of aged rats. *Neuroreport* 8:3823-3827.

22. Duchemin, A.M., Ren, Q., Mo, L., Neff, N.H., Hadjiconstantinou, M. (2002) GM1 ganglioside induces phosphorylation and activation of Trk and Erk in brain. *Journal of Neurochemistry* 81(4):696-707.

23. Esterbauer, H., Koller, E., Slezacek, R. G., Kostner, J.F. (1986) Possible involvement of the lipid-peroxidation product 4-hydroxynonenal in the formation of fluorescent chromolipids. *Journal of Biochemistry*, 239:405-409.

24. Facci, L., Leon, A., Skaper, S.D. (1990) Excitatory amino acid neurotoxicity in cultured retinal neurons: involvement of N-Methyl D-Aspartate (NMDA) and non-NMDA receptors and effect of gangliosídeo GM1. *Journal of Neuroscience Research* 27:202-210.

25. Farooqui, T., Franklin, T., Pearl, D.K., Yates, A.J. (1997) Ganglioside GM1 enhances induction by nerve growth factor of putative dimer of TrkA. *Journal of Neurochemistry* 68:2348-2355.

26. Favaron, M., Manev, H., Alho, H., Bertolino, M. Ferret, B., Guidotti, A., Costa,

- E. (1988) Ganglioside prevent glutamate and kainate neurotoxicity in primary neuronal cultures of neonatal rat cerebellum and cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 85:7351-7365.
27. Fazzini, E., Durso, R., Davoudi, H., Szabo, G. K., Albert, M. L. (1990) GM1 gangliosides alter acute MPTP-induced behavioral and neurochemical toxicity in mice. *Journal of the Neurological Sciences* 99 (1): 59-68.
28. Figuera, M.R., Bonini, J.S., de Oliveira, T.G., Frussa-Filho, R., Rocha, J.B.T., Dutra-Filho, C.S., Rubin, M.A., Mello, C.F. (2003) GM1 ganglioside attenuates convulsions and thiobarbituric acid reactives substances production induced by the intrastriatal injection of methylmalonic acid. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 35: 465-473.
29. Figuera, M.R., Bonini, J.S., Frussa-Filho, R., Dutra-Filho, C.S., Hagen, M.E., Rubin, M.A., Mello, C.F. (2004) Monosialoganglioside increases catalase activity in cerebral cortex of rats. *Free Radical Research* 38(5): 495-500.
30. Figuera, M.R., Royes, L. F. F., Furian, A.F., Oliveira, M.S., Fiorenza, N.G., Frussa-Filho, R., Petry, J.C., Coelho, R.C., Mello, C.F. (2006) GM1 ganglioside prevents seizures, Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity inhibition and oxidative stress induced by glutaric acid and pentilenotetrazol. *Neurobiology of Disease* 22:611-623.
31. Fischer, A.B. (1987) Intracellular production of oxygen-derived free radicals. *Proceedings of a Book Lodge Symposium*, 27-29:99-104.
32. Flohé, L. & Brandt, I. (1969) Kinetics of glutathione peroxidase. *Biochimica et Biophysica Acta* 191:541-549.
33. Floyd, R.A. & Hensley, K. (2002) Oxidative stress in brain aging. Implications for therapeutics of neurodegenerative diseases. *Neurobiology of Aging* 23: 795-807.
34. Forman, D.S. & Ledeen, R.W. (1972) Axonal transport of gangliosides in the

goldfish optic nerve. *Science* 117: 630-634.

35. Fridovich, I. (1975) Superoxide dismutases. *Annual Review Biochemistry* 44:147-159.

36. Fridovich, I. (1976) Oxygen radicals, hydrogen peroxide and oxygen toxicity. In *Free radicals in biology* (Pryor, W.A. ed.) Academic Press, N.Y., p. 239-277, 1976.

37. Fridovich, I. (1978) The biology of oxygen radicals. *Science* 201: 875-880.

38. Fusco, M., Vantini, G., Schiavo, N., Zanotti, A., Zanoni, R., Facci, L., Skaper, S. D. (1993) Gangliosides and neurotrophic factors in neurodegenerative diseases: from experimental findings to clinical perspectives. *Annals of the New York Academy of Sciences* 314-317.

39. Gaetani, G. F., Galiano, S., Canepa, L., Ferraris, A.M., Kirkman, H.N. (1989) Catalase and glutathione peroxidase are equally active in detoxification of hydrogen peroxide in human erythrocytes. *Blood* 73: 334-339.

40. Geisler, F.H., Dorsey, F.C., Coleman, W.P. (1991) Recovery of motor function after spinal cord injury – a randomized, placebo-controlled trial with GM1 ganglioside. *New England Journal Medicine* 324:1829-1838.

41. Ghidoni, R., Fiorilli, A., Trinchera, M., Venerando, B., Chigorno, V., Tettamanti, G. (1989) Uptake, cell penetration and metabolic processing of exogenously administered GM1 ganglioside in rat brain. *Neurochemistry International* 15:455-465.

42. Gonatas, N.K., Stieber, A., Gonatas, J. (1983) Endocytosis of exogenous GM1 ganglioside and cholera toxin by neuroblastoma cells. *Molecular Cell Biology* 3: 91-101.

43. Hadjiconstantinou, M. & Neff, N.H. (1998a) GM1 ganglioside: in vivo and in vitro trophic actions on central neurotransmitter systems. *Journal of Neurochemistry* 70:1335-1345.

44. Hadjiconstantinou, M. & Neff, N.H. (1998b) Differential recovery of dopamine synthetic enzymes following MPTP and the consequences of GM1 ganglioside treatment. *European Journal Pharmacology*, 181:137-139.
45. Hadjiconstantinou, M., Rossetti, Z.L., Paxton, R.C., Neff, N.H. (1986) Administration of GM1 ganglioside restores the dopamine content in striatum after chronic treatment with MPTP. *Neuropharmacology* 25(9): 1075-1077.
46. Hakomori, S.I. & Igarashi, Y. (1993) Gangliosides and glycosphingolids as modulators of cell growth, adhesion and transmembrane signaling. *Advances in Lipid Research* 25: 147-162.
47. Hakomori, S.I. (1981) Glycosphingolids in cellular interaction differentiation, and oncogenesis. *Annual Review of Biochemistry*, 50, 733- 764.
48. Hakomori, S.I. (1990) Bifunctional role of glycosphingolids, modulators for transmembrane signaling and mediators for cellular interactions. *Journal of Biological Chemistry* 265:18713-18716.
49. Halliwell, B. (2001) Role of free radicals in the neurodegenerative diseases. Therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs & Aging* 18:685-716.
50. Halliwell, B. & Gutteridge, J.C. (1990) Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods in Enzymology* 186:1-63.
51. Halliwell, B. & Gutteridge, J. C. (1999) In: *Free radicals in biology and medicine*, 3<sup>a</sup> ed., New York, Oxford University Press, 1999.
52. Halliwell, B. (1994) Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutrition Reviews* 52:5253-52280.
53. Hansson, H.A., Holmgren, L., Svennerholm, L. (1977) Ultrastructural localization of cells membrane GM1 ganglioside by cholera toxin. *Proceedings of National Academy of Sciences USA*, 74:3782-3786.

54. Harris, M. E., Carney, J. M., Cole, P. S., Hensley, K., Howard, B. J., Martin, L., Bummer, P., Wang, Y., Pedigo, N. W. (1995)  $\beta$ -amyloid peptide-derived, oxygen-dependent free radicals inhibit glutamate uptake in cultured astrocytes: implications for Alzheimer's disease. *NeuroReport* 6:1875-1879.
55. Heffner, J. E. & Repine, J. E. (1989) Pulmonary strategies of antioxidant defense. *American Reviews Respiratory Disease* 140: 531-554.
56. Higashi, H., Omori, A., and Yamagata, T. (1992) Calmodulin, a gangliosídeo-binding protein: binding of gangliosides to calmodulin in the presence of calcium. *Journal of Biology Chemistry* 267: 9831-9838.
57. Hirrlinger, J., Resch, A., Gutterer, J. M., Dringen, R. (2002) Oligodendroglial cells in culture effectively dispose of exogenous hydrogen peroxide: comparison with cultured neurones, astroglial and microglial cells. *Journal of Neurochemistry* 82:635-644.
58. Ho, Y.-S., Xiong, Y., Ma, W., Spector. A., and Ho, D. (2004) Mice lacking catalase develop normally but show differential sensitivity to oxidant tissue injury. *Journal of Biological Chemistry* 279(31):32804-32812.
59. Huckman, T. D., Sutphin, M. S., Mitrovic, L. (1993) Oxidative stress in a clonal cell line of neuronal origin: effects of antioxidant enzyme modulation. *Journal of Neurochemistry* 60:2046-2058.
60. Karpiak, S.E., Graf, L., Rapport, M. M. (1976) Antiserum to brain gangliosides produces recurrent epileptiform activity. *Science* 194:735-737.
61. Karpiak, S.E., Mahadik, S. P., Graf, L., Rapport, M. M. (1981) An immunological model of epilepsy: seizures induced by antibodies to GM1 ganglioside *Epilepsia*22:189-196.
67. Karpiak, S.E. & Mahadik, S.P. (1990) Enhanced cortical maturation: gangliosides

an in CNS plasticity. *Progress in Brain Research* 85:299-309.

62. Katoh-Semba, R., Skaper, S. D., Varon, S. (1984) Interaction of GM1 ganglioside with PC12 pheochromocytoma cells: serum and NGF-dependent effects on neuritic growth (and proliferation). *Journal of Neuroscience Research* 12:299-310.

63. Klenk, E. (1935) *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem* 235:24-36.

64. Krajnc, D., Wemlinger, T.A., Neff, N., Hadjiconstantinou, M. (1994) Neonatal hypoxia: early neurotransmitter responses and the consequences of treatment with GM1 ganglioside. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 211:1299-1305.

65. Kwak, D.H., Kim, S.M., Lee, D.H., Kim, J.S., Lee, S.U., Jung, K.Y., Seo, B.B., Choo, Y.K. (2005) Differential expression patterns of gangliosides in the ischemic cerebral cortex produced by middle cerebral artery occlusion. *Molecules and Cells* 20:354-360.

66. Lazzarewicz, J.W., Salinska, E., Speina, E., Gadamski, R. (1994) Effect of MK-801 and ganglioside GM1 on postischemic prostanoid release and hippocampal lesion in gerbil brain. *Acta Neurobiologiae Experimentalis* 54:293-305.

67. Lazzaro, A., Seren, M.S., Koga, T., Zanoni, R., Schiavo, N., Manev, H. (1994) GM1 reduces infarct volume after focal cerebral ischemia. *Experimental Neurology* 125:278-285.

68. Ledeen R.W. & Yu, R.K. (1982) Gangliosides: Structure, isolation and analysis. in: Gisburg, V. (Ed), *Methods in Enzymology*, Academic Press, New York, 33, 139-191.

69. Ledeen, R.W. (1978) Ganglioside structures and distribution: are they localized at the nerve ending? *Journal of Supramolecular Structure* 8:1-17.

70. Ledeen, R.W. (1984) Biology of gangliosides: neuritogenic and neuronotrophic properties. *Journal of Neuroscience Research* 12:147-159.

71. Liu, T. H., Beckman, J. S., Freeman, B. A., Hogan, E.L., Hsu, C.Y. (1989) Polyethylene glycol-conjugated superoxide dismutase and catalase reduce ischemic brain injury. *American Journal of Physiology* 256: 589-593.
72. Lombardi, G. & Moroni, F. (1992) GM1 ganglioside reduces ischemia-induced excitatory amino acid output: a microdialysis study in the gerbil hippocampus. *Neuroscience Letters* 134(2): 171-174.
73. Machlin, L. J. & Bendich, A. (1987) Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *The FASEB Journal* 1: 441-445.
74. Mahadik, S.P., Hawver, D.B., Hungund, B.L., Li, Y.S., Karpiak, S.E. (1989) GM1 ganglioside treatment after global ischemia protects changes in membrane fatty acids and properties of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, ATPase and Mg<sup>2+</sup> ATPase. *Journal of Neuroscience Research* 24:402-412.
75. Mahadik, S.P. & Karpiak, S.E. (1988) Gangliosides in treatment of neural injury and disease. *Drug Development Research*, 15: 337-360.
76. Mahadik, S.P., Makar, T.K., Murthy, J.N., Ortiz, A., Wakade, C.G., Karpiak, S.E. (1993) Temporal changes in superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and catalase levels in primary and peri-ischemic tissue. Monosialoganglioside (GM1) treatment effects. *Molecular and Chemical Neuropathology* 18(1-2): 1-14.
77. Maiorino, M., Gregolin, C., Ursini, F. (1990) Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Methods in Enzymology*, 186: 448-457.
78. Matsuyama, T., Shimizu, S., Nakasuma H., Michishita, H., Tagaya, M., Sugita, M. (1994) Effect of recombinant superoxide dismutase on manganese superoxide dismutase gene expression in gerbils after ischemia. *Stroke* 25:1417-1424.

79. Maulik, N., Das, D.K., Cogineni, M., Cordis, G.A., Avrova, N., Denisova, N. (1993) Reduction of myocardial ischemic reperfusion injury by sialylated glycosphingolipids, gangliosides. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 22: 74- 81.
80. McCord, J. M. (1987) Oxygen-derived radicals: A link between reperfusion and inflammation. *Free Radical Biology & Medicine*, 46: 2402-2406.
81. Meneghini, R. (1987) A toxicidade do oxigênio. *Ciência Hoje*, 5: 57-62.
82. Miele, M., Desole, M. S., Enrico, P., Miele, E. (1990) Selective pharmacological changes of regional ascorbic acid metabolism in the brain. *La Clinica Terapeutica*, 134: 345-353.
90. Mills, G.C. (1960) Glutathione peroxidase and the destruction of hydrogen peroxidase in animal tissues. *Archives of Biochemistry Biophysics* 86:1-5.
83. Mo, L. Ren, Q., Duchemin, A.M., Neff, N.F., Hadjiconstantinou, M. (2005) GM1 and ERK signaling in the aged brain. *Brain Research* 1054:125-134.
84. Mocchetti, I. (2005) Exogenous gangliosides, neuronal plasticity and repair, and the neurotrophins. *Cellular and Molecular Life Sciences* 62:2283-2294.
85. Moreno, S., Mugnaini, E. and Ceru, M. P. (1995) Immunocytochemical localization of catalase in the central nervous system of the rat. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 43 (12):1253–1267.
86. Mueller, S., Riedel, H. D., Stremmel, W. (1997) Direct evidence for catalase as the predominant H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-removing enzyme in human erythrocytes. *Blood* 90:4973-4978.
87. Mutoh, T., Tokuda, A., Miyadai, T. (1995) Ganglioside GM1 binds to the Trk protein and regulates receptor function. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 92: 5087-5091.
88. Nold, M. & Wennemers, H. (2004) Peptide damage under Fenton conditions is sequence-dependent. *Chemical Communications* 16: 1800-1801.

89. Orlando, P., Cocciante, G., Ippolito G., Massari, P., Roberti, S., Tettamanti, G. (1979) The fate of tritium labeled GM1 ganglioside injected in mice. *Pharmacological Research Communications* 11:759-773.
90. Oshino, N., Oshino, R., Chance, B. (1973) The characteristics of the "peroxidatic" reaction of catalase in ethanol oxidation. *Biochemical Journal* 131(3): 555-563.
91. Polo, A., Kirschner, G., Guidotti, A., Costa, E. (1994) Brain content of glycosphingolipids after oral administration of monosialogangliosides GM1 and LIGA20 to rats. *Molecular and Chemical Neuropathology* 21:41-53.
92. Rabin, S.J. & Mocchetti, I. (1995) GM1 ganglioside activates the high-affinity nerve growth factor receptor Trk A. *Journal of Neurochemistry* 65:347-354.
93. Rahmann, H. (1995) Brain gangliosides and memory formation. *Behavioral Brain Research* 66:105-116.
94. Raiteri, M., Versace, P., Marchi, M. (1985) GM1 monosialoganglioside inner ester induces early recovery of striatal dopamine uptake in rats with unilateral nigrostriatal lesion. *European Journal of Pharmacology* 118: 347-350.
95. Reiter, R.J. (1995) Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. *The FASEB Journal* 9(7): 526–533.
96. Rice-Evans, C., Burdon, R. (1993) Free radical-lipid interactions and their pathological consequences. *Progress in Lipid Research* 32:71-110.
97. Saqr, H.E., Pearl, D.K., Yates, A.J. (1993) A review and predictive models of ganglioside uptake by biological membranes. *Journal of Neurochemistry* 61: 395-411.
98. Schneider, J. S. (1998) GM1 ganglioside in the treatment of Parkinson's disease. *Annals of the New York Academy of Sciences* 845:363-373.
99. Schneider, J. S. (1992) Effects of age on GM1 ganglioside-induced recovery of

concentrations of dopamine in the striatum in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated mice. *Neuropharmacology* 31: 185-192.

100. Schneider, J.S. (1995) Effects of age on GM1 ganglioside-induced recovery of concentrations of dopamine in the striatum in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated mice. *Neuropharmacology* 31(2): 185-192.

101. Schneider, J.S., Smith, M.G., Di Stephano, L. (1994) GM1 Ganglioside treatment partially reverses the nigrostriatal dopamine defect in the weaver mutant mouse. *Brain Research* 636:353-356.

102. Schneider, J.S. & Di Stephano, L. (1995) Enhanced restoration of striatal dopamine concentrations by combined GM1 ganglioside and neurotrophic factor treatments. *Brain Research* 674:260-264.

103. Singleton, D.W., Lu, C.L., Colella, R., Roisen, F.J. (2000) Promotion of neurite outgrowth by protein kinase inhibitors and ganglioside GM1 in neuroblastoma cells involves MAP kinase ERK1/2. *International Journal of Developmental Neuroscience* 18:797-805.

104. Skaper, S.D., Facci, L., Leon, A. (1990) Gangliosides attenuate the delayed neurotoxicity of aspartic acid in vitro. *Neuroscience Letters* 117: 154-159.

105. Skaper, S.D., Facci, L., Milani, D., Leon, A. (1989) Monosialoganglioside GM1 protects against anoxia-induced neuronal death in vitro. *Experimental Neurology* 106(3): 297-305.

106. Sonnino, S., Ghidoni, R., Marchesini, S., Tettamanti, G. (1979) Cytosolic gangliosides: occurrence in calf brain as ganglioside-protein complexes. *Journal of Neurochemistry* 33: 117-121.

107. Southorn, P. A. & Powis, G. (1988) Free radicals in medicine I. Nature and biologic reactions. *Mayo Clinic Proceedings* 63: 381-389.

108. Svennerholm, L. (1956) Composition of gangliosides from human brain. *Nature* 177:524-525.
109. Svennerholm, L. (1963) Isolation of gangliosides. *Acta Chemica Scandinavica* 17: 239-250.
110. Svennerholm, L. (1980) Gangliosides and synaptic transmission. *Advances Experimental Medicine and Biology* 125:533-544.
111. Svennerholm, L., Brane, G., Karlsson, I., Lekman, A., Ramstrom, I., Wikkelso, C. (2002) Alzheimer disease - effect of continuous intracerebroventricular treatment with GM1 ganglioside and a systematic activation programme. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders* 14:128-136.
112. Svennerholm, L., et al., eds (1994) Cooperative effects of gangliosides on trophic factor-induced neuronal cell recovery and synaptogenesis: studies in rodents and subhuman primates. In: *Progress in Brain Research*, v. 101, Amsterdam, Elsevier, p. 337-355, 1994.
113. Tan, W.K., Williams, C.E., Gunn, A.J., Mallard, E.C., Gluckman, P.D. (1993) Pretreatment with monosialoganglioside GM1 protects the brain of fetal sheep against hypoxic-ischemic injury without causing systemic compromise. *Pediatric Research* 34: 18-22.
114. Tanaka, K., Dora, E., Urbanics, R., Greenberg, J. H., Toffano, G., Reivich, M. (1986) Effect of the ganglioside GM1, on cerebral metabolism, microcirculation, recovery kinetics of ECoG and histology, during the recovery period following focal ischemia in cats. *Stroke* 17:1170-1178.
115. Tettamanti, G. & Riboni, L. (1993) Gangliosides and modulation of the function of neural cells. *Advances in Lipid Research* 25: 253-267.
116. Thomas, C.E. & Aust, S.D. (1985) Rat liver microsomal NADPH-dependent

release of iron from ferritin and lipid peroxidation. *Free Radical Biology and Medicine* 1:293-300.

117. Tiurin, V.A., Bagrov, A. Ia., Fedorova, O.V., Zhabko, E.P., Tiurina, Y.Y., Avrova, N.F., Das, D.K., Kagan, V.E. (1992) Ganglioside protection of the erythrocytes membranes in myocardial ischemia. *Biulleten Eksperimentalnoi Biologii I Meditsiny* 114:366-368.

118. Toffano, G., Savoini, G.E., Moroni, F., Lombardi, G., Calza, L., Agnati, L.F. (1983) GM1 ganglioside stimulates the regeneration of dopaminergic neurons in the central nervous system. *Brain Research* 261: 163-166.

119. Tyler, D. D. (1975) Polarographic assay and intracellular distribution of superoxide dismutase in rat liver. *Journal of Biochemistry* 147: 493-504.

120. Vaccarino, F., Guidotti, A., Costa, E. (1987) Ganglioside inhibition of glutamate-mediated protein kinase C translocation in primary cultures of cerebellar neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 84:8707-8711.

121. Vanier, M.T., Holm, M., Ohman, R., Svennerholm, L. (1971) Developmental profiles of gangliosides in human and rat brain. *Journal of Neurochemistry* 18: 581-592.

130. Vetrano, A. M., Heck, D.E., Mariano, T.M., Mishin, V., Laskin, D.L., Laskin, J.D. (2005) Characterization of the oxidase activity in mammalian catalase. *Journal of Biological Chemistry* 280:35372-35381.

122. Wassman, S., Wassmann, K., Nickenig, G. (2004) Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. *Hypertension* 44:381-386.

123. Weihmuller, F.B., Hadjiconstantinou, M., Bruno, J.P., Neff, N.H. (1988) Administration of GM1 ganglioside eliminates neuroleptic-induced sensorimotor deficits in MPTP-treated mice. *Neuroscience Letters* 92: 207-212.

124. Wells, J.M., Ventura, R.F., Eisenhauer, P.B., McKenna, D. C., Fine, R. E.,

Ullman, M. D. (1996) Transport of GM1 and GM1 inner ester across an in vitro model of the blood-brain barrier. *Neuroscience Letters* 21:121-124.

125. Wendel, A. (1981) Glutathione Peroxidase. *Methods in Enzymology*, 77: 325-332.

126. Wiegandt, H. Gangliosides. In: Neuberger, A., Van Deenen, L.L.M. (1985) (Eds), *Glycolipids, New Comprehensive Biochemistry*, 199-260. Elsevier, Amsterdam.

127. Wu, G., Lu, Z-H., Wang, J., Wang, Y., Xie, X., Meyenhofer, M.F., Ledden, R.W. (2005) Enhanced susceptibility to kainate-induced seizures, neuronal apoptosis, and death in mice lacking gangliotetraose gangliosides: protection with LIGA 20, a membrane-permeant analog of GM1. *Journal of Neuroscience* 25:11014-11022.

128. Yu, R.K. & Saito, M. (1989) Structure localization of brain gangliosides. In: Margolis, R.U., Margolis, R.K. (eds.), *Neurobiology of Glycoconjugates*, pp 1-41. Plenum, New York, 1989.

129. Yu, R.K. & Saito, M. (1992) Gangliosides and neuronal-astrocytic interactions. *Progress in Brain Research* 94:333-338.

130. Zhang, J. & Piantadosi, C. A. (1991) Prevention of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation by MAO protects against CNS O<sub>2</sub> toxicity. *Journal of Applied Physiology*, 71:1057-1061.

---

## **7 ANEXOS**

## 7.1 Lista de Figuras e Tabelas

### CAPÍTULO I

**Figura 1:** Estrutura química do Monossialotetra-hexosilgangliosídeo (GM1).

Fonte: Adaptado de Mocchetti, 2005.

**Figura 2:** Dismutação do radical superóxido formando peróxido de hidrogênio e O<sub>2</sub>.

**Figura 3:** (A) Reação catalisada pela GPx. O substrato também pode ser outros hidroperóxidos além do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. (B) Reação de redução da GSSG pela glutathione redutase, usando NADPH como coenzima.

**Figura 4:** Reação de decomposição do peróxido de hidrogênio pela catalase.

**Figura 5:** Representação da expressão de “blots” de RNA mensageiro (A), atividade “in situ” (B) e “blots” de proteína (C) para a catalase em diferentes tecidos. Fonte: Ho et al., 2004.

### CAPÍTULO II

**Figure 1:** Effect of GM1 (50 mg/kg, i.p.), injected 24 h or 30 min before sacrifice, on catalase activity in hippocampus, cortex and striatum *ex vivo*. Data are mean + S.E.M. for n = 8-11 in each group.

**Figure 2:** Effect of GM1 (50 mg/kg, i.p.), injected 24 h or 30 min before sacrifice, on the content of hemoglobin in hippocampus, cortex and striatum *ex vivo*. Data are mean + S.E.M. for n = 8-11 in each group.

**Figure 3:** Effect of GM1 (50 mg/kg, i.p.), injected 30 min before sacrifice, on catalase activity in hippocampus, cortex and striatum in perfused and non-perfused animals *ex vivo*. Data are mean + S.E.M. for n = 6-7 in each group.

**Figure 4:** Effect of GM1 (50 mg/kg, i.p.), injected 30 min before sacrifice, on the content of hemoglobin in hippocampus, cortex and striatum in perfused and non-perfused animals *ex vivo*. Data are mean + S.E.M. for n = 6-7 in each group.

**Figure 5:** Regression analysis of catalase activity in the brain against the respective area under the Soret band (content of hemoglobin), in hippocampus (5A), cortex (5B) and striatum (5C), in animals previously injected with NaCl (solid line, 30 animals) or GM1 (50 mg/kg, i.p., dotted line, 33 animals).

**Figure 6:** Effect of GM1 (100, 300 or 1000  $\mu$ M) on catalase activity *in vitro*. Data are mean + S.E.M. for n = 6 in each group. \*Indicates a significant difference ( $P=0.043$ ) compared with the control group.

**Figure 7:** GM1 increases the width of pial vessels. Baseline pial vessels width (7A) and 30 minutes after administration of GM1 (50 mg/kg, i.p., 7B). Arrows indicate vasodilated pial vessels, compared to baseline (x 40), n= 2.

**Table 1:** Effect of GM1 (50 mg/kg, i.p.), injected 24 h or 30 min before sacrifice, on blood catalase activity. Data are mean  $\pm$  S.E.M. for n = 8-11 in each group.

### CAPÍTULO III

**Tabela 1:** Efeito do GM1 (100; 300 ou 1000 $\mu$ M) sobre o conteúdo de hemoglobina nas fatias de córtex cerebral (“slices”). Dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão para n = 6 em cada grupo.

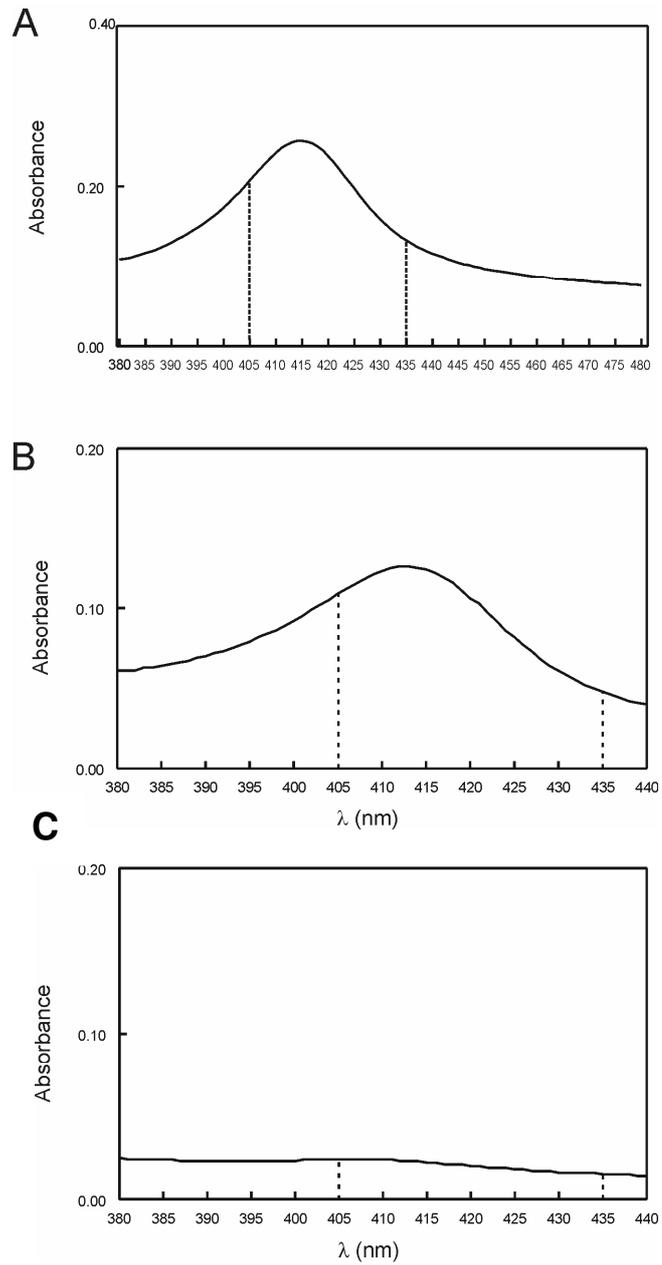
**Figura 1:** Representação do Scan de uma amostra de sangue (A), cérebro (B) e de uma amostra de cérebro de um animal perfundido (C). A área pontilhada corresponde à área da Banda de Soreto.

## 7.2 Dados não mostrados

**Tabela 1:** Efeito do GM1 (100; 300 ou 1000 $\mu$ M) sobre o conteúdo de hemoglobina nas fatias de córtex cerebral (“slices”). Dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão para n = 6 em cada grupo.

| Grupo            | Conteúdo de Hemoglobina/mg proteína |
|------------------|-------------------------------------|
| Controle         | 0.86 $\pm$ 0.03                     |
| GM1 100 $\mu$ M  | 0.96 $\pm$ 0.03                     |
| GM1 300 $\mu$ M  | 0.94 $\pm$ 0.03                     |
| GM1 1000 $\mu$ M | 0.92 $\pm$ 0.10                     |

**Figura 1:** Representação do Scan de uma amostra de sangue (A), cérebro (B) e de uma amostra de cérebro de um animal perfundido (C). A área pontilhada corresponde à área da Banda de Soret.



### 7.3 Trabalhos desenvolvidos no período não relacionados à

#### Dissertação:

- Alpha- tocopherol protects against pentylenotetrazol- and methylmalonate-induced convulsions. RIBEIRO, Marinei Cristina Pereira; ÁVILA, Daiana Silva de; SCHNEIDER, Carmen Matiauda; HERMES, Fernando Sthal; FURIAN, Ana Flávia; OLIVEIRA, Mauro Schneider; RUBIN, Maribel Antonello; LEHMANN, Martina; KRIEGLSTEIN, Josef; MELLO, Carlos Fernando de. *Epilepsy Resarch* (ISSN/ISBN: 0920-1211), v. 66, n. 1-3, p. 185-194, 2005.

- Nitric oxide is involved in the memory facilitation induced by spermidine in rats. GUERRA, Gustavo Petri; MELLO, Carlos Fernando; SAUZEM, Patricia Dutra; BERLESE, Daiane Bolzan; FURIAN, Ana Flávia; TABARELLI, Zuleica; RUBIN, Maribel Antonello. *Psychopharmacology* (ISSN/ISBN: 00333158) v. 186, p. 150-158, 2006.

- GM1 ganglioside prevents seizures, Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup> -ATPase activity inhibition and oxidative stress induced by glutaric acid and pentilenotetrazol. FIGHERA, Michele Rechia; ROYES, Luiz Fernando Freire; FURIAN, Ana Flávia; OLIVEIRA, Mauro Schneider; FIORENZA, Natália Gindri; FRUSSA FILHO, Roberto; PETRY, João Carlos; COELHO, Rafael Correa; MELLO, Carlos Fernando de. *Neurobiology of Disease* (ISSN/ISBN: 09699961), v. 22, p. 611-623, 2006.

- Effectiveness of creatine monohydrate on seizures and oxidative damage induced by methylmalonate. ROYES, Luiz Fernando Freire; FIGHERA, Michele Rechia; FURIAN, Ana Flávia; OLIVEIRA, Mauro Schneider; FIORENZA, Natália Gindri; MYSKIW, Jociane de Carvalho; PETRY, João Carlos; COELHO, Rafael Correa; MELLO, Carlos Fernando de. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* (ISSN/ISBN: 00913057), v. 83, p. 136-144, 2006.

- Methylene blue prevents methylmalonate-induced seizures and oxidative damage in rat striatum. FURIAN, Ana Flávia; FIGHERA, Michele Rechia; OLIVEIRA, Mauro Schneider; FERREIRA, Ana Paula de Oliveira; FIORENZA, Natália Gindri; MYSKIW, Jociane de Carvalho; PETRY, João Carlos; COELHO, Rafael Correa; MELLO, Carlos Fernando de; ROYES, Luiz Fernando Freire. *Neurochemistry International* (ISSN/ISBN: 0197-0186), v. p. in press, 2006.

- The role of nitric oxide on the convulsive behavior and oxidative stress induced by methylmalonate: an electroencephalographic and neurochemical study. ROYES, Luiz Fernando Freire; FIGHERA, Michele Rechia; FURIAN, Ana Flávia; OLIVEIRA, Mauro Schneider; FIORENZA, Natália Gindri; PETRY, João Carlos; COELHO, Rafael Correa; MELLO, Carlos Fernando de. *Epilepsy Research* (ISSN/ISBN: 0920-1211), v., n., p. in press, 2006.