



UFSM

Tese de Doutorado

**EFEITO DO MONOSSIALOGLANGLIOSÍDEO GM1
SOBRE AS ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS,
NEUROQUÍMICAS E ELETROGRÁFICAS
INDUZIDAS PELO ÁCIDO GLUTÁRICO E NAS
DEFESAS ANTIOXIDANTES NO SNC DE RATOS**

Michele Rechia Fighera

PPGBT

SANTA MARIA, RS, BRASIL

2006

**EFEITO DO MONOSSIALOGLANGLIOSÍDEO GM1
SOBRE AS ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS,
NEUROQUÍMICAS E ELETROGRÁFICAS
INDUZIDAS PELO ÁCIDO GLUTÁRICO E NAS
DEFESAS ANTIOXIDANTES NO SNC DE RATOS**

por

Michele Rechia Fighera

Tese apresentada ao Curso de Doutorado
do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica da
Universidade Federal de Santa Maria, como requisito parcial para
a obtenção do grau de **DOUTOR em Bioquímica Toxicológica**

PPGBT

SANTA MARIA, RS, BRASIL

2006

*Essa tese é dedicada à minha família e aos meus amigos.
Agradeço por terem acreditado que um dia chegaria aqui.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Professor Carlos F. de Mello, pela oportunidade de fazer parte de seu grupo, por todos os ensinamentos e confiança, mas principalmente por ter sido um grande amigo.

À professora Rosa pelo carinho e colaboração durante a realização deste trabalho.

Ao Nando que além de grande amigo e companheiro, foi um “anjo-da-guarda” que esteve sempre ao meu lado, nas horas mais difíceis e, que nunca deixou de acreditar em mim. Te amo muito.

À minha família, em especial, à minha dinda, pelo amor e carinho, pelo apoio e por nunca desistirem de acreditar em mim.

À minha Mãe e meu Pai, pelo apoio, carinho, amor, paciência e compreensão.

À minha irmã, Patrícia, por todo incentivo, parceria e pela paciência que teve comigo.

A Aninha, Mauro e Natasha por me acompanhar desde o início deste trabalho e, por serem muito mais do que grandes colaboradores, mas acima de tudo, grandes amigos.

Ao Rafael e João pelo carinho, amizade e apoio durante a realização deste trabalho.

A todos os colegas do laboratório, tanto da “velha como da nova guarda”, pelo carinho e por todos os momentos felizes que compartilhamos juntos.

A todos os meus amigos por serem meus amigos e incentivadores.

*Descobri como é bom chegar
quando se tem paciência
e para se chegar onde quer que seja,
aprendi que não é preciso dominar a força,
mas a razão.*

*É preciso antes de mais nada,
Querer.*

*Um dia é preciso parar de sonhar,
tirar os planos das gavetas e,
de algum modo, partir...*

Amyr Klink

RESUMO

Tese de Doutorado
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

EFEITO DO MONOSSIALOGLIANGLIOSÍDEO GM1 SOBRE AS ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS, NEUROQUÍMICAS E ELETROGRÁFICAS INDUZIDAS PELO ÁCIDO GLUTÁRICO E NAS DEFESAS ANTIOXIDANTES NO SNC DE RATOS

Autora: Michele Rechia Fighera
Orientador: Carlos Fernando de Mello
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 12 de maio de 2006.

O monossialogangliosídeo (GM1) é um componente natural de membrana plasmática que está envolvido no crescimento, reconhecimento e diferenciação celular, além de proteger o SNC da ação dos radicais livres. No presente estudo investigou-se o efeito do GM1 sobre a atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GPx), assim como na quimiluminescência e capacidade antioxidante total (TRAP) em córtex cerebral de ratos machos adultos *ex vivo* e *in vitro*. A administração sistêmica de GM1 (50 mg/kg, i.p.; duas doses: 24 horas e 30 minutos antes do sacrifício) reduziu a quimiluminescência e aumentou significativamente a atividade da CAT *ex vivo*. A adição de GM1 (10^3 - 10^4 nM) ao meio de incubação diminuiu a atividade da CAT *in vitro*. Estes resultados sugerem que o efeito neuroprotetor do GM1 não é devido à ação antioxidante intrínseca deste glicoesfingolípídeo, mas devido ao aumento secundário das defesas antioxidantes e/ou uma redução da geração de radicais livres. Além disso, avaliamos se o GM1 tinha efeito neuroprotetor em um modelo experimental da acidemia glutárica, um erro inato do metabolismo caracterizado pelo acúmulo tecidual de ácido glutárico (GA) e alterações neurológicas, como degeneração estriatal e convulsões. A administração de GM1 preveniu as convulsões, o aumento da produção dos marcadores do dano oxidativo (carbonilação protéica total e substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico - TBARS) e a inibição da atividade da Na^+, K^+ -ATPase induzidas pelo GA (4 $\mu\text{mol}/2 \mu\text{l}$) em estriado de ratos. Além disso, os episódios convulsivos induzidos por GA apresentaram uma correlação significativa com a inibição da atividade da Na^+, K^+ -ATPase no estriado injetado, mas não com os níveis dos marcadores do estresse oxidativo. A adição de GM1 (50 – 200 μM) ao meio de incubação preveniu a inibição da Na^+, K^+ -ATPase, mas não reduziu o dano oxidativo induzido por GA (6 mM) *in vitro*. A administração intraestriatal de muscimol (46 pmol/0,5 μl), um agonista de receptor GABA_A , mas não dos antagonistas de receptores glutamatérgicos, MK-801 (3 nmol/0,5 μl) e DNQX (8 nmol/0,5 μl), preveniu as convulsões e a inibição da atividade da Na^+, K^+ -ATPase induzidas por GA. A proteção do GM1 e muscimol contra as convulsões induzidas por GA apresentou uma correlação significativa com a manutenção da atividade da Na^+, K^+ -ATPase no estriado injetado com GA. Desde que o GM1 e o muscimol preveniram os efeitos neurotóxicos induzidos pelo GA, investigou-se a ação do GM1 após a administração intraestriatal de pentilenotetrazol (PTZ), um antagonista de

receptores GABA_A. O tratamento com GM1 preveniu as convulsões, o dano oxidativo e a inibição da atividade da Na⁺,K⁺-ATPase induzidas por PTZ (1,8 μmol/2 μl). Esses dados sugerem que a atividade da Na⁺,K⁺-ATPase e mecanismos mediados pela ativação de receptores GABAérgicos podem ser de grande importância para a atividade convulsiva induzida por GA, bem como nos mecanismos de neuroproteção induzidos pelo GM1.

Palavras-chaves: Monossialogangliosídeo; radicais livres; defesas antioxidantes; Ácido glutárico; TBARS; carbonilação protéica; Na⁺,K⁺-ATPase, convulsões; MK-801; muscimol; DNQX; pentilenotetrazol.

ABSTRACT

PhD Thesis
Post-graduating Course in Toxicological Biochemistry
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

EFFECT OF MONOSIALOGLIANGLIOSIDE GM1 ON GLUTARIC ACID-INDUCED BEHAVIORAL, NEUROCHEMICAL AND ELECTROGRAPHIC ALTERATIONS AND CNS ANTIOXIDANT DEFENSES OF RATS

Author: Michele Rechia Fighera
Advisor: Carlos Fernando de Mello
Date and place of defense: Santa Maria, May 12th, 2006.

Monosialoganglioside (GM1) is a component of most cell membranes and is thought to play a role in development, recognition and cellular differentiation. Furthermore, GM1 is a neuroprotective agent that has been reported to scavenge free radicals generated during reperfusion and to protect receptors and enzymes from oxidative damage. In the present study we investigate the effect of GM1 on the catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) activities, on the spontaneous chemiluminescence and total radical-trapping potential (TRAP) in cortex of rats *ex vivo* and *in vitro*. Systemic GM1 administration (50 mg/kg, i.p.; twice) reduced spontaneous chemiluminescence and increased CAT activity *ex vivo*. On the other hand, GM1 (10^3 - 10^4 nM) reduced CAT activity *in vitro*. The other parameters were not affected by GM1 administration. These findings agree with the view that the antioxidant action of GM1 is not due to an intrinsic antioxidant activity of this glycolipid, but due to a secondary decrease of reactive species generation and/or increase of antioxidant defenses. Moreover, we evaluated whether GM1 could have a neuroprotective action on the experimental model of glutaric acidemia, an inherited metabolic disorder characterized by glutaric acid (GA) accumulation and neurological dysfunction, as striatal degeneration and convulsion. The systemic GM1 administration (50 mg/kg, i.p. twice) protected against the convulsions, oxidative damage markers increase (total protein carbonylation and thiobarbituric acid-reactive substances - TBARS) production and Na^+ , K^+ -ATPase activity inhibition induced by GA (4 μmol / 2 μl) in striatum of rats. Furthermore, convulsive episodes induced by GA strongly correlated with Na^+ , K^+ -ATPase activity inhibition in the injected striatum, but not with oxidative stress marker measures. In addition, GM1 (50-200 μM) protected against Na^+ , K^+ -ATPase inhibition induced by GA (6 mM), but not against oxidative damage *in vitro*. Intra-striatal administration of muscimol (46 pmol/striatum), a GABA_A receptor agonist, but not glutamatergic receptor antagonists MK-801 (3 nmol/striatum) and DNQX (8 nmol/striatum), prevented GA-induced convulsions and inhibition of Na^+ , K^+ -ATPase activity. The protection of GM1 and muscimol against GA-induced seizures strongly correlated with Na^+ , K^+ -ATPase activity maintenance in the injected striatum with GA. Since GM1 and muscimol prevented neurotoxic effects induced by GA, we investigated the GM1 action after intra-striatal administration of pentylenetetrazole (PTZ), a GABA_A receptor antagonist. GM1 treatment prevented seizures, Na^+ , K^+ -ATPase inhibition, and increase of TBARS and protein carbonyl induced by PTZ (1.8 μmol /striatum)

in the rats striatum. Furthermore, these data suggest that Na^+, K^+ -ATPase and GABA_A receptor-mediated mechanisms may play important roles in GA-induced seizures and in their prevention by GM1.

Keywords: Monosialoganglioside; free radicals; antioxidant defenses; glutaric acid; TBARS; protein carbonylation; Na^+, K^+ -ATPase; seizures; MK-801; muscimol; DNQX; pentilenotetrazole.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura Química do Monossialotetra-hexosilgangliosídeo.....	6
Figura 2 – Configuração eletrônica das Espécies Ativas de Oxigênio (EAO).....	11
Figura 3 – Fontes de radicais livres e sistema de defesa antioxidante.....	12
Figura 4 – Dismutação do radical superóxido por ação da superóxido dismutase.....	13
Figura 5 – Reação de Fenton.....	13
Figura 6 – Reação de Haber-Weiss.....	13
Figura 7 – Reação de decomposição do peróxido de hidrogênio pela catalase.....	15
Figura 8 – (A) Reação catalisada pela GPx. O substrato também pode ser outros hidroperóxidos além do H ₂ O ₂ . (B) Reação de redução da GSSG pela glutathione redutase, usando NADPH como coenzima.....	16
Figura 9 – Reações de neutralização dos radicais O ₂ [•] (A), [•] OH (B) e HO ₂ [•] (C) e regeneração de vitamina E (D).....	17
Figura 10 - Reação do radical lipoperóxido com vitamina E formando lipoperóxido e radical α -tocoferil da vitamina E.....	18
Figura 11 – Metabolismo da enzima glutaril-CoA desidrogenase : enzima responsável pela conversão do glutaril CoA a crotonil CoA na rota de degradação dos aminoácidos lisina, hidróxi-lisina e triptofânio.....	25
Figura 12 – Movimentos distônicos de membros inferiores.....	26
Figura 13 – Discinesia facial.....	26
Figura 14 – Ressonância nuclear magnética de crânio: a) aumento da intensidade do sinal nos núcleos caudato e putamen; b) dilatação de ventrículos cerebrais	27
Figura 15 – Mecanismos sugeridos de neurodegeneração induzidos pelo ácido glutárico.....	32

LISTA DE ABREVIATURAS

↑ ou ↓ - orientação dos spins dentro de um orbital

ABAP - dicloreto de 2, 2' azobis (2-amidino-propano)

AMPA - ácido DL- α -amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico

AMPc - adenosina monofosfato cíclico

ATP - adenosina trifosfato

CAT – catalase

CO₂ - dióxido de carbono

CPS - contagens por segundo

Cu⁺¹ - íon cuproso

Cu⁺² - íon cúprico

CuSO₄ - sulfato de cobre

CuZnSOD - superóxido dismutase dependente de cobre e zinco

DNPH – dinitrofenil-hidrazina

DTNB - 5,5'- dithio-bis (2-ácido nitrobenzóico)

DNQX – (6,7- dinitroquinoxalina – 2,3- diona)

EAO - espécie ativa de oxigênio

EAN - espécies ativas de nitrogênio

EDTA - ácido etilenodiamino tetracético

EIM – Erro Inato do Metabolismo

Fe - ferro

Fe⁺² - ferro II

Fe⁺³ - ferro III

GM1- Monossilangliosídeo

GPx - glutaciona peroxidase

GR - glutaciona redutase

GSH - glutaciona (forma reduzida)

GSSG - glutaciona oxidada

H⁺ - próton

H₂O - água

H₂O₂ - peróxido de hidrogênio

HCl - ácido clorídrico
INT – cloreto de 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolio
i.p.- intraperitoneal
KCl - cloreto de potássio
LOO⁻ - radical peroxil
LPO - lipoperoxidação
MDA - malondialdeído
MK-801 – (maleato de dizocilpina)
MMA - ácido metilmalônico
MnSOD - superóxido dismutase dependente de manganês
MPP⁺ - 1-metil-4-fenilpiridina
MPTP - 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetra-hidropiridina
NaCl - cloreto de sódio
NAD⁺ - nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma oxidada)
NADH - nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)
NADPH - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)
NaOH - hidróxido de sódio
NGF - fator de crescimento neuronal
NMDA - N-metil-D-aspartato
NO[•] - óxido nítrico
NOS - óxido nítrico sintase
°C - grau Celsius
O₂ - oxigênio molecular
O₂[•] - radical superóxido
OH⁻ - radical hidroxila
ONOO⁻ - peroxinitrito
ONOOH - peroxinitrito protonado
PTZ - Pentilenotetrazol

RL - radicais livres
rpm - rotações por minuto
s e p - subníveis de energia no átomo
SDS - dodecil sulfato de sódio
Se -selênio

-SH - grupo tiol

SNC - sistema nervoso central

SOD - superóxido dismutase

TBA - ácido tiobarbitúrico

TBARS - substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

t-BOOH - hidroperóxido de terc- butil

TCA - ácido tricloracético

TRAP - potencial antioxidante total

TrK - receptor acoplado à tirosina kinase

Zn - zinco

π - orbital molecular pi

δ - orbital molecular sigma

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	iii
AGRADECIMENTOS	iv
RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
I. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	1
II. REVISÃO DE LITERATURA	4
I.1. Gangliosídeos.....	5
I.1.1. Estrutura química e nomenclatura.....	5
I.1.2. Localização.....	6
I.1.3. Gangliosídeos endógenos.....	7
I.1.4. Gangliosídeos exógenos.....	8
I.2. Radicais livres e Espécies reativas.....	10
I.2.1. Conceito e Formação dos radicais livres e espécies reativas.....	10
I.2.2. Sistema de defesas antioxidantes contra as espécies ativas de oxigênio e nitrogênio	14
I.2.2.1. Defesas enzimáticas.....	15
I.2.2.1.1. Catalase.....	15
I.2.2.1.2. Superóxido Dismutase.....	15
I.2.2.1.3. Glutathione peroxidase.....	16
I.2.2.2. Defesas não enzimáticas.....	17
I.2.2.2.1. Antioxidantes hidrossolúveis.....	17
I.2.2.2.2. Antioxidantes lipossolúveis.....	18
I.2.3. Radicais Livres e sistema nervoso central.....	19

I.2.4. Reatividade das espécies ativas de oxigênio em sistemas biológicos.....	19
I.2.4.1. Oxidação de Proteínas.....	20
I.2.4.2. Lipoperoxidação.....	20
I.2.4.3. Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase.....	22
I.2.5. Relação das Espécies Reativas e Erros Inatos do Metabolismo.....	23
I.3. Erros Inatos do Metabolismo.....	23
I.4. Acidemia Glutárica.....	25
I.4.1. Excitotoxicidade na Acidemia glutárica.....	27
I.4.2. Modulação do Sistema GABAérgico.....	28
I.4.3. Modulação do Sistema Glutamatérgico.....	28
I.5. Excitotoxicidade, Formação de Espécies Reativas e Convulsões.....	29
III. OBJETIVOS ESPECÍFICOS - ARTIGO I.....	35
IV. OBJETIVOS ESPECÍFICOS - ARTIGO II.....	43
V. DISCUSSÃO GERAL.....	58
VI. CONCLUSÕES.....	67
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

I. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

Os gangliosídeos são glicosfingolipídeos, que se localizam na parte externa das membranas plasmáticas, concentrando-se principalmente no sistema nervoso (Hakomori, 1981). A utilização clínica dos gangliosídeos, especialmente do monossialogangliosídeo (GM1), tem sido proposta para uma grande diversidade de patologias relacionadas ao SNC (Schneider et al., 1994; Svemerholm 2002). Essa diversidade de aplicações clínicas provavelmente está relacionada à considerável variedade de mecanismos de ação e dos efeitos farmacológicos promovidos por esses glicosfingolipídios.

Mahadik & Karpiak (1986) relataram que a administração intraperitoneal de GM1 promove uma recuperação tanto na assimetria comportamental quanto na perda da atividade da Na^+, K^+ -ATPase que se seguem à lesão da via nigroestriatal por 6-OH-dopamina em ratos. Outros estudos demonstraram que os gangliosídeos também protegem os neurônios após a hipoglicemia, mantendo os níveis de lactato por mais tempo (Zoli et al., 1990), e previne a morte neuronal induzida por apoptose (Ferrari et al., 1995).

Tem sido sugerido que um possível mecanismo de neuroproteção do gangliosídeo GM1 também seja devido à sua ação antioxidante (Maulik et al., 1993; Figuera, et al., 2003). De fato, o tratamento com GM1 é capaz de proteger receptores e enzimas do dano oxidativo após eventos isquêmicos (Mahadick et al., 1989), além de prevenir a lipoperoxidação e as convulsões promovidas pela injeção intraestriatal de metilmalonato (MMA), um metabólito que acumula na acidemia metilmalônica, um erro inato do metabolismo (Figuera et al., 2003).

A acidemia glutárica tipo I (AG-I) é um outro erro inato do metabolismo caracterizado bioquimicamente pela deficiência da atividade da glutaril-CoA desidrogenase (E.C 1.3.99.7), causando um acúmulo de ácidos orgânicos, entre eles o ácido glutárico (AG), no sangue e no cérebro dos pacientes afetados (Goodman et al., 1995). Clinicamente, esta acidemia é caracterizada por alterações neurológicas, como degeneração estriatal e convulsões (Hoffmann et al., 2001). Embora as alterações neurológicas sejam predominantes na AG-I, pouco se sabe sobre os mecanismos pelos quais o AG é neurotóxico.

No SNC, a neurotoxicidade tem sido relacionada a um aumento na produção de radicais livres pelos tecidos. O cérebro é particularmente mais vulnerável a ação de radicais livres do que os outros tecidos devido ao seu alto consumo de O_2 , maior conteúdo lipídico e baixos níveis das defesas antioxidantes (Halliwell & Gutteridge, 1999). A liberação aumentada de aminoácidos excitatórios (AAE), como o glutamato, é capaz de induzir a morte

neuronal devido à estimulação excessiva de seus receptores e à produção de radicais livres (Rothman and Ohey, 1987). O AG tem estrutura semelhante ao glutamato, e assim como esse neurotransmissor, é capaz de induzir a despolarização neuronal devido à ativação de receptores glutamatérgicos (Lima et al., 1998, Kolker et al., 1999). A estimulação excessiva desses receptores pode induzir a um aumento do Ca^{2+} intracelular. Essa cascata de eventos pode ativar um grande número de toxinas envolvidas no fenômeno da neurotoxicidade, dentre as quais o radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$), um dos mais potentes radicais livres envolvido em diversas doenças neurodegenerativas, como Parkinson, Huntington, Alzheimer e esquizofrenia (Mahadik and Mukherjee, 1996). O radical $\cdot\text{OH}$ é capaz de reagir com fosfolípidos e proteínas de membrana, induzindo a uma lipoperoxidação e à oxidação protéica, e provavelmente, à morte neuronal (Mahadik and Mukherjee, 1996), assim como é capaz de reduzir a atividade de enzimas antioxidantes e da Na^+, K^+ -ATPase *in vitro* (Maulik et al., 1993; Puntarulo, et al., 1999). Recentes estudos mostraram que o AG aumenta a produção de radicais livres e inibe a atividade de enzimas antioxidantes e da Na^+, K^+ -ATPase no cérebro de ratos *in vitro* (Oliveira Marques et al., 2003). Embora tenha sido proposto que o estresse oxidativo esteja envolvido nas alterações neurológicas da AG-I, ainda são escassos na literatura estudos que investiguem a especificidade dos mecanismos de ação do AG nas convulsões e na atividade da Na^+, K^+ -ATPase, bem como seus efeitos na lipoperoxidação e carbonilação protéica no estriado de ratos. Além disso, dada à capacidade neuroprotetora do GM1 em vários modelos de neurotoxicidade, e a escassez de medidas terapêuticas efetivas da acidemia glutárica, torna-se importante determinar se a administração de GM1 previne as alterações comportamentais, neuroquímicas e eletrográficas induzidas pelo AG e, se esse gangliosídeo altera a atividade das enzimas antioxidantes no SNC de ratos.

REVISÃO DE LITERATURA

II-REVISÃO DE LITERATURA

II.1. Gangliosídeos

II.1.1. Estrutura química e nomenclatura

Os gangliosídeos são glicoesfingolipídios 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. No que diz respeito aos gangliosídeos cerebrais, o ácido siálico mais abundante é o N-acetil-neuramínico (Yu & Saito, 1989). Os resíduos de ácido siálico se encontram unidos a oligossacarídeos neutros através de ligações β -glicosídicas, sendo que estes resíduos de açúcares neutros podem ser a glicose, galactose, N-acetilglicosamina e fucose (Tettamanti & Riboni, 1993).

Baseando-se em sua composição oligossacarídica neutra, os gangliosídeos são classificados em diferentes séries (gala, hemato, ganglio, neolacto, globo, isoglobo), sendo que os gangliosídeos que predominam no tecido nervoso pertencem à série gânglio. A porção oligossacarídica liga-se, por meio de uma ligação β -glicosídica, a uma ceramida, constituída de uma cadeia longa de ácido graxo e uma esfingosina, que estão unidas por uma ligação amida (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. Finalmente, adiciona-se a letra a ou b para indicar a configuração do isômero quando for o caso. Assim, o GM1, é constituído por um resíduo de ácido siálico e quatro açúcares neutros (Figura 1).

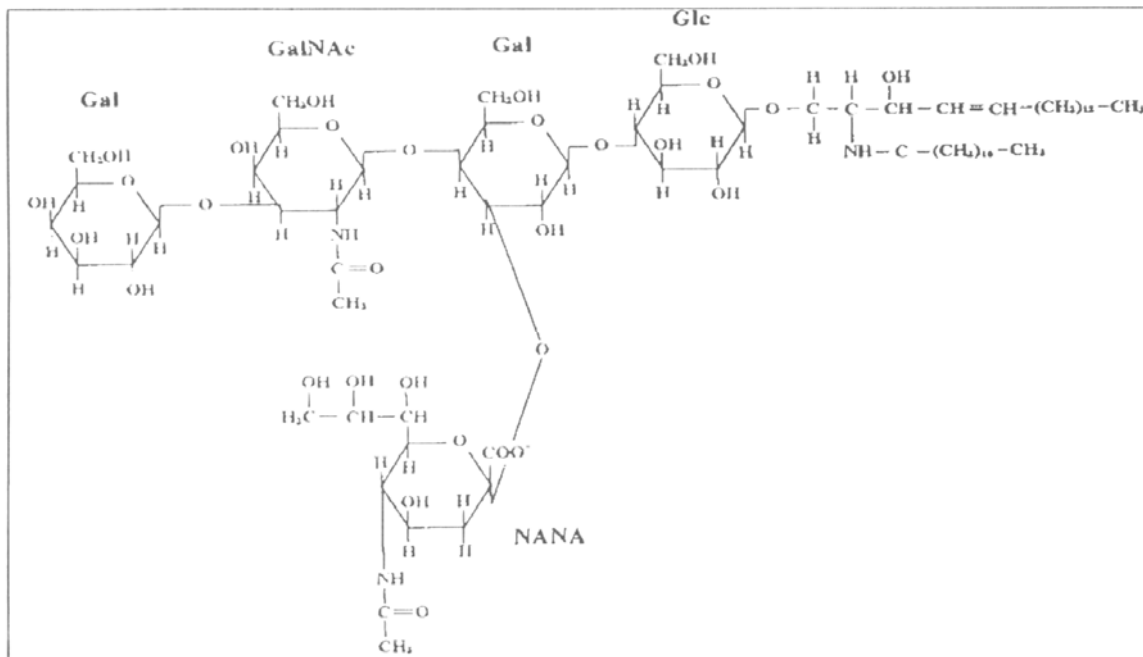


Figura 1 - Estrutura Química do Monossialotetra-hexosilgangliosídeo

II.1.2. Localização

Os gangliosídeos são componentes das membranas plasmáticas, localizando-se principalmente na parte externa dessas membranas (Hakomori, 1981). Os gangliosídeos estão presentes nas membranas de todos os tecidos de vertebrados (Ledeen & Yu, 1982), concentrando-se no sistema nervoso (Wiegandt, 1985), onde representam cerca de 10% do conteúdo total de lipídios (Ledeen, 1984). No cérebro de mamíferos os gangliosídeos predominantes são o GM1, o GD1a, o GD1b e o GT1b, 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 da membrana (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). Entretanto os gangliosídeos também podem estar localizados dentro de estruturas na membrana celular. Essas estruturas podem ser isoladas porque elas são insolúveis em

detergente à 4°C e, são chamadas de domínios de membrana resistentes a detergente, ou ainda, de microdomínios enriquecidos de glicosfingolípídeos (MEG). A toxina da cólera e anticorpos contra gangliosídeo também tem sido usados para separar os MEG de diferentes composições de gangliosídeos. Exemplos de MEG ricos em GM1 e GM3 foram descritos na literatura. Além disso, muitos componentes de vias de transdução de sinal também estão localizados nos MEG (Miljan e Bremer, 2002). A habilidade para identificar e isolar esses MEG de diferentes composições pode auxiliar a responder muitas questões biológicas, incluindo aquelas relacionadas a transdução de sinal no sistema nervoso.

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). Uma pequena quantidade dessas substâncias, portanto, localiza-se intracelularmente, em parte ligada às organelas responsáveis pelo transporte intracelular e metabolismo e em parte ligada a carreadores protéicos solúveis (Sonnino et al., 1979).

II.1.3 Gangliosídeos endógenos

As altas concentrações de gangliosídeos no tecido nervoso, em comparação a outros tecidos, sugerem que esses compostos sirvam a um propósito específico neste tecido (Svennerholm, 1980). Diversas ações foram sugeridas para os gangliosídeos endógenos, e acredita-se que eles exerçam seu papel biológico basicamente por meio de dois tipos de funções: (1) como receptores, podendo interagir com outras células, com a matriz extracelular ou com substâncias exógenas e (2) como moduladores de proteínas funcionais de membrana, tais como receptores de fatores tróficos e transportadores (Hakomori et al., 1990).

Dentre as ações endógenas propostas para os gangliosídeos, a participação dessas substâncias nos processos de crescimento, reconhecimento e diferenciação celular foi sugerida (Hakomori, 1981). Em função do aumento significativo no conteúdo dos principais gangliosídeos durante alguns estágios da diferenciação neuronal, tem sido postulada uma necessidade funcional dessas substâncias nos processos de neuritogênese e sinaptogênese (Vanier et al., 1971). Assim, acredita-se que o crescimento e a maturação do SNC sejam particularmente influenciados por esses glicosfingolípídios, particularmente porque que a concentração e a topografia de certos tipos de gangliosídeos sofrem importantes mudanças

durante o desenvolvimento cerebral (Karpiak & Mahadik, 1990). Nesse sentido, foi demonstrado que a administração de gangliosídeo facilita o aprendizado e aumenta os níveis de acetilcolinesterase cortical em ratos neonatos (Karpiak et al., 1984). Além disso, a administração de anticorpos antigangliosídeos no período perinatal resulta em déficit comportamental, diminuição da dendritogênese e sinaptogênese (Kasarkis et al., 1981).

Finalmente, o fato dos gangliosídeos estarem presentes em altas concentrações nas terminações sinápticas levou à investigação de um possível papel dessas substâncias na neurotransmissão. 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, foi mostrado que os gangliosídeos GM1e GQ1b são capazes de aumentar o influxo de íons cálcio (Ca^{++}) em sinaptossomas (Ando, 1997) e que o GD3 faz parte de receptores de neurotransmissores como a serotonina (Matinyan et al., 1989).

II.1.4. Gangliosídeos exógenos

Durante os últimos 15 anos muitos estudos *in vitro* e *in vivo* realizados, tanto em animais como no homem, têm utilizado gangliosídeos exógenos para avaliar o papel de cada gangliosídeo em um processo celular específico ou em uma função (Saqr et al., 1993; Vital et al., 1995), devido à habilidade que essas substâncias têm de ser incorporadas à membrana plasmática neuronal, atuando como gangliosídeos endógenos (Moss et al., 1976). Embora somente 1 a 3% da dose de GM1 administrada parenteralmente ultrapasse a barreira hematoencefálica (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) e doença de Parkinson (Schneider et al., 1994).

Essa diversidade de aplicações clínicas provavelmente está relacionada à considerável variedade de mecanismos de ação e dos efeitos farmacológicos promovidos por esses glicosfingolípídios. 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 dos gangliosídeos podem estar relacionadas à potencialização da ação do fator de crescimento neural (*nerve growth factor* - NGF) promovida por essa substância. O mecanismo pelo qual os gangliosídeos potencializam as ações do NGF ainda é controverso. Gonatas e colaboradores (1983) sugeriram que esses glicosfingolípídios 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, e regula sua função. Em outro estudo foi sugerido, ainda, 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; Miljan e Bremer, 2002).

Tendo em vista o efeito anti-isquêmico, um possível papel protetor dos gangliosídeos na neurotoxicidade por AAE e algumas neurotoxinas tem sido investigado. De fato, o GM1 atenua a citotoxicidade promovida pelo L-aspartato em cultura de células cerebelares de ratos (Skaper et al., 1990) e promove a recuperação de diferentes tipos de lesão no sistema dopaminérgico (Toffano et al., 1983; Agnati et al., 1985; Raiteri et al., 1985; 1992). Vários estudos têm mostrado os efeitos protetores do GM1 no parkinsonismo induzido por 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina (MPTP), como a restauração do conteúdo dopaminérgico (Hadjiconstantinou et al., 1986; Weihmuller et al., 1988; Scheneider & Yuwiller, 1989; Fazzini et al., 1990; Schneider, 1992; Schneider & DiStefano, 1995), a atividade da tirosina hidroxilase (Weihmuller et al., 1988; Hadjiconstantinou & Neff, 1990) e a recuperação do déficit comportamental (Weihmuller et al., 1988; Fazzini et al., 1990) secundário à injeção desta neurotoxina.

Tem sido proposto que um possível mecanismo de neuroproteção do gangliosídeo GM1 esteja relacionado à sua ação antioxidante, tanto *in vivo* como *in vitro* (Avrova et al., 1994; Maulik et al., 1993). De fato, o GM1 inibe a lipoperoxidação e protege receptores e enzimas, como a Na^+, K^+ -ATPase, contra o dano oxidativo induzido pela isquemia (Mahadik et al., 1989). Entretanto, o mecanismo pelo qual o GM1 exerce seu efeito antioxidante ainda não está completamente esclarecido. Maulik e colaboradores (1993) sugerem que esse glicosfingolípídio tem atividade antioxidante direta, já que é capaz de neutralizar a ação dos radicais livres, como os radicais hidroxil e superóxido, induzidos por isquemia em coração de ratos *in vitro*. Por outro lado, Fighera e colaboradores (2003) não verificaram ação antioxidante intrínseca do GM1, uma vez que este glicosfingolípídeo não reduziu a lipoperoxidação induzida por MMA no estriado de ratos *in vitro*. Nesse mesmo estudo, os autores sugeriram que a ação neuroprotetora do GM1 poderia ser devido ao aumento

secundário dos níveis de ascorbato estriatal. Outra explicação seria que os efeitos neuroprotetores do GM1 podem ser mediados, pelo menos em parte, por tirosinas quinases associadas com fatores de crescimento, assim como, a proteínas quinases C e a ativação de fatores de transcrição (Ariga, et al., 1998).

Além disso, o GM1 também tem sido proposto como um agente anticonvulsivante, desde que ele inibe a atividade epileptiforme recorrente induzida pela administração intracerebral de anticorpos contra gangliosídeos cerebrais (Karpiak et al., 1976; 1981) e atenua as convulsões induzidas pelo MMA no estriado de ratos (Figuera et al., 2003). Entretanto, o GM1 não altera as convulsões induzidas por estimulação elétrica em ratos (Albertson et al., 1987), e não está bem esclarecido se o GM1 pode prevenir as convulsões induzidas por outros agentes convulsivantes e se esta prevenção está relacionada com suas propriedades antioxidantes.

II.2. Radicais Livres e Espécies Reativas

II.2.1. Conceito e Formação dos Radicais Livres e Espécies Reativas

Do ponto de vista químico, um RL é definido como qualquer átomo, grupo de átomo ou molécula capaz de existir sob forma independente e que contém um ou mais elétrons desemparelhados (Del Maestro, 1980; Southorn & Powis, 1988; Halliwell & Gutteridge, 1999) (Figura 2). 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 quanto os radicais livres que não possuem elétron não-pareado na última camada e, portanto não podem ser classificados como radicais livres (Dröge, 2002). Essas substâncias são classificadas de maneira mais ampla como espécies ativas do oxigênio (EAO) ou espécies ativas de nitrogênio (EAN).

As EAO 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, captam um elétron de outro átomo ou molécula que se torna uma molécula radicalar (Rice-Evans & Burdon, 1993).

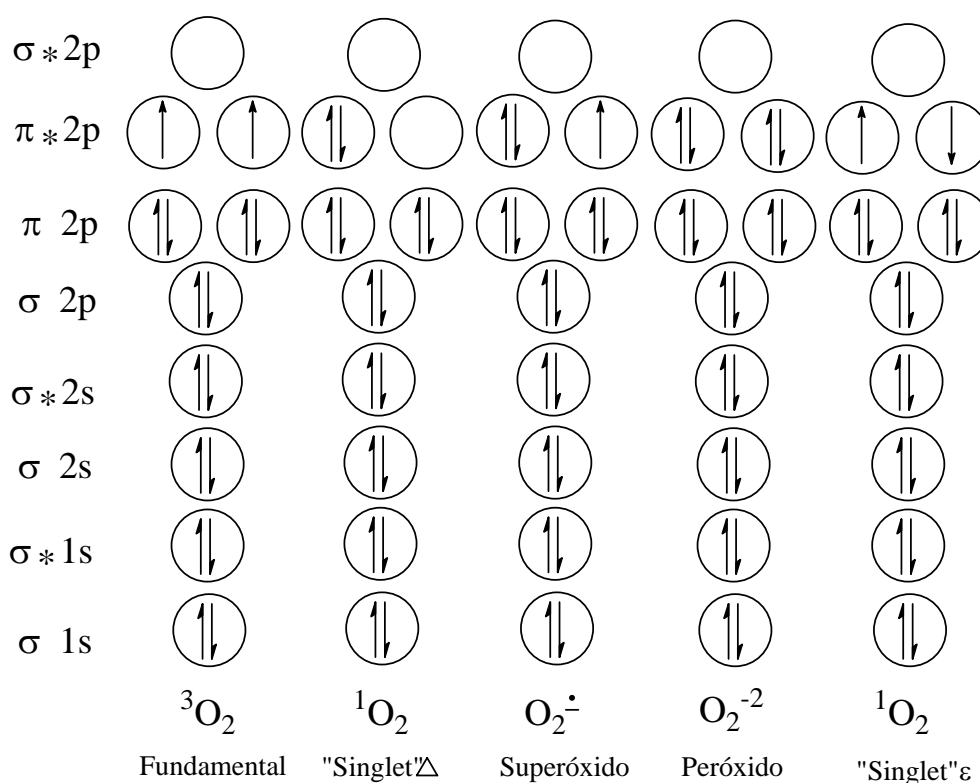
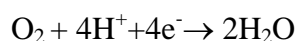


Figura 2 – Configuração eletrônica das Espécies Ativas de Oxigênio (EAO) (Halliwell & Gutteridge, 1999).

Uma fonte importante de RLs é o sistema de transporte de elétrons mitocondrial (Del Maestro, 1980; Southorn & Powis, 1988), sendo seu principal sítio de formação o complexo citocromo b-ubiquinona (Tyler, 1975). Na mitocôndria, a 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 origina água diretamente. Como 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 ($\text{O}_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ambos listados na figura acima, e o radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$). 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 (Fisher, 1987).

O superóxido é o primeiro intermediário formado a partir da redução incompleta do oxigênio molecular na formação da H_2O (Harris, 1992), e a partir dele podem se formar outras espécies ativas de oxigênio como o radical hidroxil e o peróxido de hidrogênio (Esterbauer et al., 1986). Muitos sistemas enzimáticos catalisam a redução do oxigênio à radical superóxido. Podemos citar como exemplos: xantina oxidase, aldeído oxidase, flavina oxidase e peroxidases (Fridovich, 1976, McCord, 1985). Varias outras enzimas como aquelas que catalisam a formação de prostaglandinas (ciclooxigenases) e leucotrienos (lipoxigenases), também são fontes de superóxido (Machlin & Bendich, 1987) (Figura 3).

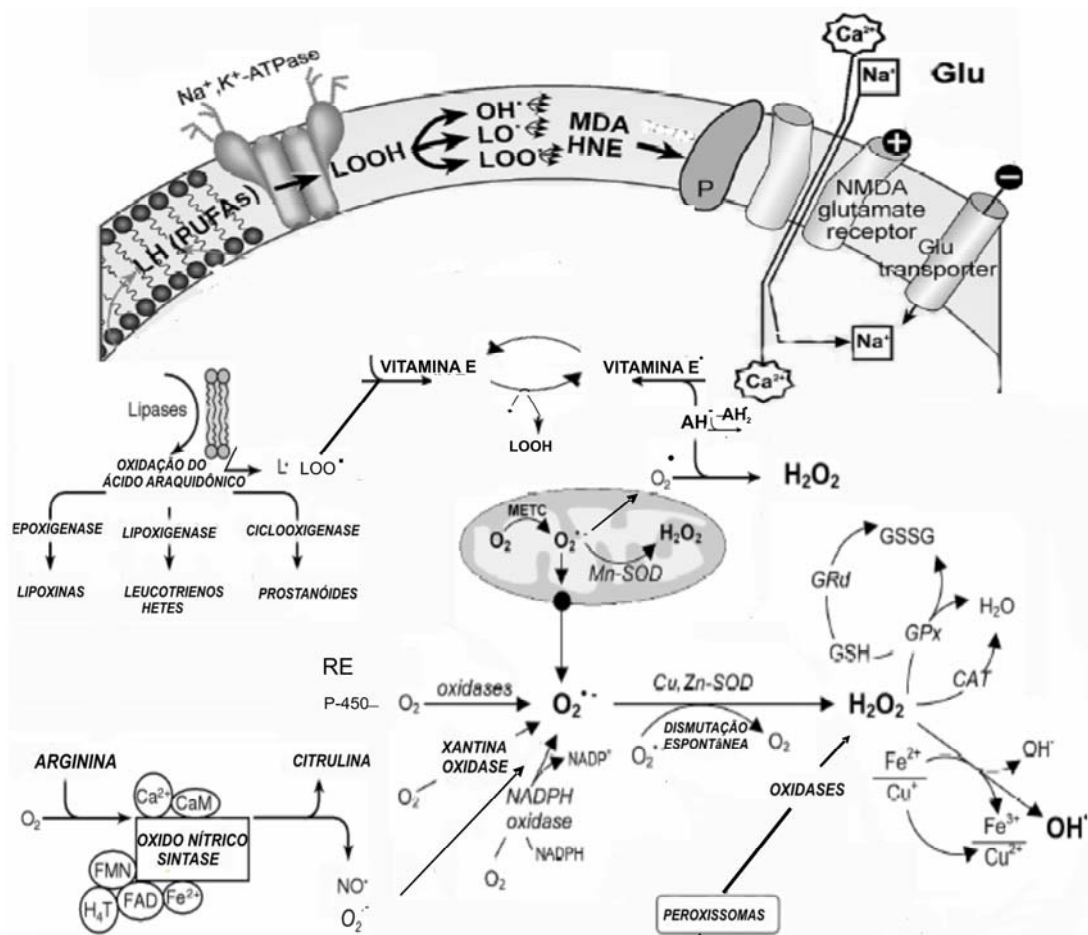


Figura 3. Fontes de radicais livres e sistema de defesa antioxidante. A enzima óxido nítrico sintase, a cadeia de transporte de elétrons e metabolismo do ácido araquidônico são as principais fontes de LOO^{\bullet} , radical peroxil; L^{\bullet} , radical alcoxil; $HETES$, ácidos hidroieicosatetraenóico; H_4T , tetraiodobiopterina; $O_2^{\bullet-}$, radical superóxido; CaM , cálcio/calmodulina; NO^{\bullet} , óxido nítrico; FAD , flavina adenina dinucleotídeo; FMN , flavina mononucleotídeo. O AH^{\bullet} , ascorbato; $AH_2^{\bullet-}$, radical semihidroascorbato; vitamina E^{\bullet} , radical tocoferil.

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) (Figura 4) (Fridovich, 1975; 1978). A isoforma da SOD presente na matriz mitocondrial é dependente de manganês (MnSOD), enquanto isoforma da SOD presente no citosol é a dependente de cobre e zinco (CuZnSOD) (Fridovich, 1978). O RL mais reativo é o $\cdot\text{OH}$, que pode ser gerado pelo H_2O_2 quando reage com os íons cobre (Cu^{+1}) ou ferro (Fe^{+2}). Esta reação é conhecida como reação de Fenton (Figura 5).

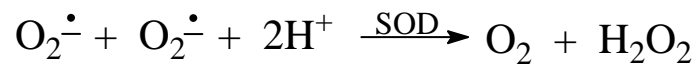


Figura 4 - Dismutação do radical superóxido por ação da superóxido dismutase (SOD).

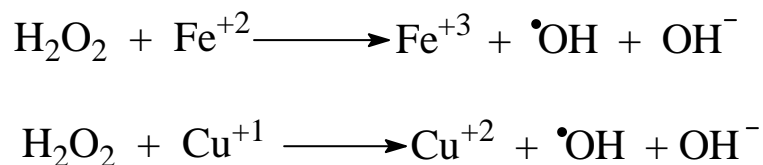


Figura 5 – Reação de Fenton.

Os metais de transição podem catalisar a reação entre o H_2O_2 e $\text{O}_2^{\cdot-}$, levando à produção de radical $\cdot\text{OH}$. Esta reação é conhecida como reação de Haber-Weiss, e é catalisada pelo cobre (II) ou ferro (III) (Figura 6), que pode ser oriundo da ferritina, hemoglobina ou mioglobina (Werns & Luchesi, 1990).

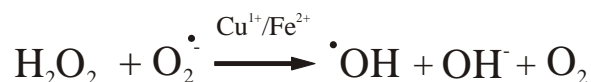


Figura 6 – Reação de Haber-Weiss

As EAN também são formadas tanto no citosol como na mitocôndria, e as mais representativas são o óxido nítrico (NO^\bullet) e o peroxinitrito (ONOO^-). O NO^\bullet é gerado a partir da arginina por ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS), presente no citosol e na mitocôndria (Riobo et al., 2002). O NO^\bullet é essencial para vasorregulação, agregação plaquetária e neurotransmissão, mas em excesso inibe a citocromo-c oxidase levando a conseqüente formação de O_2^\bullet (Forfia et al., 1999). O ONOO^- , entretanto, é formado a partir de uma reação entre NO^\bullet e O_2^\bullet (Radi et al., 1994) e ele pode difundir-se para o meio intra ou extracelular e então promover a oxidação de lipídeos, proteínas e DNA (Beckman et al., 1996). Além disso, o ONOO^- pode causar inibição da cadeia respiratória levando à morte neuronal e produzir íons nitrônio, que são capazes de nitrificar resíduos de tirosina (Beckman et al., 1996).

Entretanto, a toxicidade exercida pelas espécies reativas não está somente relacionada a danos biológicos ao organismo, mas também podem exercer uma atividade benéfica, como na eliminação de bactérias fagocitadas através dos neutrófilos (Packer et al., 1996).

II.2.2. Sistema de defesas antioxidantes contra as Espécies Ativas de Oxigênio e Nitrogênio

Os seres vivos dispõem de mecanismos protetores para evitar o acúmulo de espécies ativas de oxigênio (Halliwell, 1994) que incluem mecanismos enzimáticos e não-enzimáticos (Figura 3). As principais enzimas antioxidantes são a superóxido dismutase, a catalase e a glutathione peroxidase. Essas enzimas evitam o acúmulo de O_2^\bullet e de H_2O_2 , e a conseqüente produção de $^\bullet\text{OH}$, contra o qual não existe nenhum sistema enzimático de defesa. Existem substâncias que neutralizam ação do $^\bullet\text{OH}$, levando à formação de produtos menos tóxicos. As substâncias que neutralizam os radicais livres na fase de iniciação ou de propagação da lipoperoxidação, levando à formação de produtos menos tóxicos, são os denominados *scavengers*, enquanto aquelas que atuam absorvendo a energia de excitação dos RLs, neutralizando-os, são chamados de *quenchers* (Machlin & Bendich, 1987).

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

II.2.2.1. Defesas enzimáticas

II.2.2.1.1. Catalase

Esta enzima está presente em todos os tipos de células de mamíferos e está localizada, principalmente, num componente subcelular chamado peroxissoma. Alguns órgãos como o coração, músculo esquelético e cérebro contêm níveis mais baixos de catalase do que outros, como o fígado, e assim estão mais expostos aos danos provocados pelos RLs (Boveris & Chance, 1973). A atividade catalásica é a principal reguladora dos níveis intracelulares de H₂O₂ (Gaetani et al., 1989). A figura 7 mostra a decomposição do H₂O₂ pela catalase.

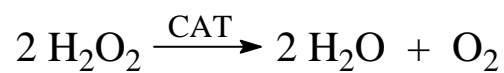


Figura 7– Reação de decomposição do peróxido de hidrogênio pela catalase.

II.2.2.1.2. Superóxido Dismutase

A superóxido dismutase (SOD) é uma enzima essencial para todas as células aeróbicas, pois catalisa a dismutação do radical superóxido, uma importante EAO, formando H₂O₂ e O₂ (Figura 4).

Existem três tipos de superóxido dismutase:

- 1) As que contêm cobre e zinco no sítio ativo (Cu Zn-SOD) são encontradas no citoplasma em maior quantidade, mas estão presentes também nos peroxissomas, lisossomas e no espaço intermembranas da mitocôndria;
- 2) As que contêm manganês (Mn-SOD), e estão presentes na matriz mitocondrial;
- 3) As que contêm ferro, e que são encontradas em plantas e bactérias (Fridovich, 1975; Chance et al., 1979).

Este grupo de enzimas catalisa a reação de dois radicais superóxido, com conseqüente formação de H₂O₂, que é menos reativo e é degradado por outras enzimas (catalase ou glutathione peroxidase). Essa reação pode acontecer espontaneamente em condições fisiológicas, porém quando catalisada pela SOD a velocidade de dismutação é 10⁴ vezes maior (Chance et al., 1979; Southorn & Pavis, 1988).

II.2.2.1.3. Glutathione Peroxidase

A glutathione peroxidase (GSH-Px), quando foi descoberta por Mills em 1957, era considerada uma enzima responsável apenas pela degradação do H_2O_2 , tal como a catalase. Hoje, esta enzima, que é encontrada em muitos tecidos animais, é considerada um dos principais sistemas antioxidantes. A enzima reage com uma variedade de hidroperóxidos orgânicos assim como com o H_2O_2 (Wendel, 1981), e é a principal responsável pela degradação do peróxido de hidrogênio no sistema nervoso.

Há dois tipos de GSH-Px:

- 1) A que utiliza o selênio como cofator, encontrada tanto na mitocôndria como no citosol;
- 2) A que não depende de selênio, encontrada no citosol e responsável pela metabolização de hidroperóxidos orgânicos.

A GSH-Px catalisa a reação de hidroperóxidos com a glutathione reduzida (GSH) para formar glutathione oxidada (GSSG) e produto de redução do hidroperóxido (figura 8A).

Fisiologicamente, a GSH-Px atua acoplada a enzima glutathione redutase (GR) que, por sua vez, catalisa redução de GSSG, usando NADPH como coenzima (Figura 8B) (Mills, 1960; Maiorino et al., 1990).



Figura 8 - (A) Reação catalisada pela GPx. O substrato também pode ser outros hidroperóxidos além do H_2O_2 . (B) Reação de redução da GSSG pela glutathione redutase, usando NADPH como coenzima.

II.2.2.2. Defesas não enzimáticas

II.2.2.2.1. Antioxidantes hidrossolúveis

Glutationa: é um tripeptídeo de baixo peso molecular que contém grupo tiol (-SH) e é substrato para a GPx (Figura 8A). A glutatona oxidada (GSSG) é reduzida a GSH pela enzima glutatona redutase (GRd) que utiliza NADPH para catalizar a reação (Figura 8B).

Além de atuar como substrato para a família de GPx, a GSH previne a oxidação de grupos -SH de proteínas evitando a formação de pontes dissulfeto e, além disso, é capaz de quelar íons cobre e diminuir a produção de radicais livres (Halliwell e Gutteridge, 1999).

A maior parte da glutatona livre intracelular, *in vivo*, está na forma reduzida (GSH) e na forma oxidada (GSSG), mas outra parte pode ser encontrada como dissulfetos mistos com outros grupos tióis (-SH), tais como a cisteína e coenzima A. A GSH é importante na degradação de proteínas que contém pontes dissulfeto, como a insulina. Devido as suas propriedades químicas, a GSH atua como nucleófilo e como um redutor efetivo que interage com numerosos agentes eletrofílicos e oxidantes como o H_2O_2 , o $\text{O}_2^{\bullet-}$ e $\bullet\text{OH}$. Talvez sua função mais importante seja a proteção que exerce frente ao dano oxidativo, causado por espécies reativas de O_2 geradas durante o metabolismo normal das células.

Ácido ascórbico (vitamina C): é capaz de neutralizar os radicais $\text{O}_2^{\bullet-}$, $\bullet\text{OH}$ e HO_2^{\bullet} e de regenerar a vitamina E (Figura 9). Onde AH^- representa o ascorbato, $\text{A}_2^{\bullet-}$ indica o radical semihidroascorbato e vitamina E^{\bullet} se refere ao radical tocoferil. As propriedades antioxidantes do ascorbato derivam do radical semihidroascorbato, que tem baixa reatividade e pode atuar nas reações de dismutação interrompendo as reações em cadeia, ou então, reduzir-se enzimaticamente a ascorbato com baixo consumo de NADH ou GSH. A reciclagem da vitamina E é uma das mais importantes funções do ascorbato.

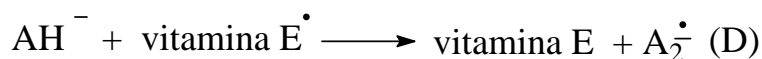
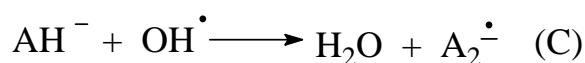
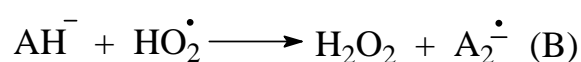
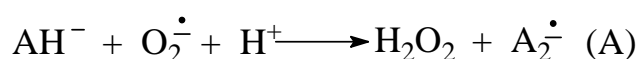


Figura 9 – Reações de neutralização dos radicais $\text{O}_2^{\bullet-}$ (A), $\bullet\text{OH}$ (B) e HO_2^{\bullet} (C) e regeneração de vitamina E (D).

II.2.2.2.2. Antioxidantes lipossolúveis

Carotenos: os β -carotenos são considerados substâncias antioxidantes porque apresentam a capacidade de neutralizar os radicais. Eles protegem os lipídios da peroxidação porque neutralizam as espécies ativas de oxigênio, principalmente o $^1\text{O}_2$ (Foote, 1979; Krinsky, 1979).

α -Tocoferol (vitamina E): é o antioxidante mais amplamente distribuído nos organismos vivos, encontrando-se em altas concentrações em muitos tecidos. Está associado às membranas como as membranas mitocondriais e retículo endoplasmático. Pode reagir tanto com lipoperóxidos quanto com radical alcóxil, sendo um efetivo protetor da LPO em membranas biológicas (Burton, 1988). A vitamina E neutraliza o $^1\text{O}_2$, o O_2^\bullet e o HO_2^\bullet e reage com o OH^\bullet . Nas reações em cadeia, um radical lipoperóxido (LOO^\bullet) reage com o grupo hidroxifenólico da vitamina E, formando-se um lipoperóxido (LOOH) e, também, um radical α -tocoferil da vitamina E (vitamina E $^\bullet$) (Figura 10). O radical da vitamina E se converte em vitamina E por meio de um doador de hidrogênio que pode ser o GSH ou o ascorbato.

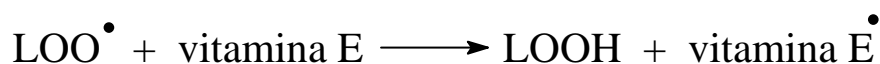


Figura 10 – Reação do radical lipoperóxido com vitamina E formando lipoperóxido e radical α -tocoferil da vitamina E.

Bilirrubina: resulta do catabolismo das hemoproteínas, estando presente na corrente sanguínea e nos tecidos. É um antioxidante que bloqueia as reações em cadeia (Halliwell & Gutteridge, 1999).

Além desses compostos podemos citar outras substâncias com ação antioxidante como: proteínas séricas, transferrina, ferritina, ceruloplasmina, oligoelementos (selênio, zinco, manganês) e flavonóides (Halliwell & Gutteridge, 1999).

Atualmente, a descoberta de novas substâncias com ação antioxidante tem despertado 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 várias patologias relacionadas ao sistema nervoso (Weihmuller et al., 1988; Fazzini et al., 1990).

II.2.3. Radicais Livres e Sistema Nervoso Central

Todos os tecidos dos organismos aeróbicos podem sofrer dano oxidativo, porém o tecido nervoso é o mais suscetível em comparação aos demais tecidos. Uma das razões é seu alto consumo de O₂, já que é responsável por aproximadamente 20% do consumo basal de O₂ corporal (Halliwell & Gutteridge, 1999). Assim, o alto consumo de O₂ pode resultar em um aumento da formação de O₂[•]. Além disso, outros fatores também contribuem para tornar o cérebro vulnerável às reações de oxidação, tais como:

- 1) É relativamente deficiente em defesas antioxidantes;
- 2) A ativação da óxido nítrico sintase neuronal (NOS) e formação de NO[•] devido a um aumento dos níveis de Ca²⁺ intracelular (Kowaltowski et al., 2001; Souza et al., 2003).
- 3) Contém altas concentrações de lipídios poliinsaturados, que servem como substrato para peroxidação lipídica (Wajner et al., 2004);
- 4) Em regiões específicas do cérebro (substância *nigra*, *caudato*, *putamen* e *globus pallidus*) o ferro encontra-se presente em altas concentrações, o que favorece a lipoperoxidação e a autooxidação de neurotransmissores devido ao OH[•] formado na reação de Fenton (Wajner et al., 2004).

II.2.4. Reatividade das espécies ativas de oxigênio em sistemas biológicos

As ERs 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 ERs e as defesas antioxidantes pode representar um mecanismo fundamental para as doenças em seres humanos (Halliwell and Gutteridge, 1999). De fato, há estudos que mostram uma redução nos níveis das defesas antioxidantes no sangue de pacientes epiléticos e em modelos experimentais de acidemias orgânicas (Ogunmekan et al., 1979; Figuera et al., 2003; Patel et al., 2004; Sudah et al., 2004; Royes et al., 2005).

Existem muitos métodos de estudo para detectar a produção de ERs. No entanto, todos eles possuem algum grau de limitação devido à alta reatividade dos radicais formados e/ou a sua migração para pontos distantes. A geração de ERs pode ser medida por vários métodos,

entre eles, quimioluminescência, peroxidação lipídica e carbonilação protéica (Brown & Kelly, 1996).

II.2.4.1. Oxidação de proteínas

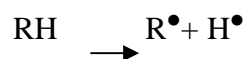
A determinação de grupos carbonil nas proteínas oxidadas tem se tornado um dos métodos bioquímicos mais utilizados na investigação do dano oxidativo protéico (Pratico e Delanty, 2000). As proteínas de membrana podem sofrer modificações de grupos tióis e nitrosilação de grupos fenólicos acarretando na fragmentação na cadeia polipeptídica. Particularmente, os aminoácidos histidina, arginina e lisina são os principais alvos das EAO para a produção de grupos carbonil (>C=O). O conteúdo de grupos carbonil nas proteínas pode ser medido após a reação deste grupo com 2, 4-dinitrofenil-hidrazina (Praticò & Delanty, 2000) para formar 2,4-dinitrofenil-hidrazona, que pode ser detectada e quantificada espectrofotometricamente ou imunoquimicamente (Levine et al., 2002).

As alterações que ocorrem nas proteínas de membrana podem modificar o transporte de íons e aumentar os níveis de Ca^{2+} intracelular (Dawson & Dawson, 1996). Além disso, a modificação oxidativa das proteínas por EAO implica na etiologia ou progressão de várias doenças (Levine et al., 2002). A oxidação de proteínas, um dos marcadores de estresse oxidativo do cérebro, está aumentada na neurodegeneração relacionada com a idade, ou em modelos experimentais de doenças neurodegenerativas, como nas doenças de Alzheimer, Huntington e Parkinson (Butterfield & Kanski, 2001), assim como em modelos de convulsões induzidos por pentilenotetrazol (PTZ) (Oliveira et al., 2004) e MMA (Ribeiro et al., 2005).

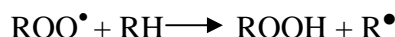
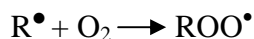
II.2.4.2. Lipoperoxidação

Por serem formadas em grande parte por lipídios insaturados e proteínas, as membranas são particularmente vulneráveis ao ataque oxidativo (Halliwell, 1994). Esses lipídios poliinsaturados reagem com as espécies reativas formando hidroperóxidos lipídicos (Halliwell, 1994).

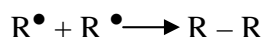
Quimicamente, o processo de lipoperoxidação (LPO) consiste de reações em cadeia e classicamente são divididas em três fases: reação de iniciação, reação de propagação e reação de terminação. Nas reações de iniciação, um RL é formado de uma espécie química não-radical livre estável:



Nas reações de propagação, também chamadas de reação central, um RL reage com uma molécula estável originando outro RL como produto:



Nas reações de terminação, dois RLs anulam seus elétrons solitários formando um produto estável (Boveris, 1998).



A LPO é um processo fisiológico contínuo que ocorre nas membranas celulares. Além de ser um fator de renovação da membrana, este processo é essencial na síntese de prostaglandinas e leucotrienos, bem como na fagocitose e pinocitose (Halliwell & Gutteridge, 1999). Por outro lado, esse processo pode se tornar tóxico quando as defesas antioxidantes são insuficientes ou quando há intensa produção de espécies reativas. O ataque das espécies reativas pode oxidar as múltiplas cadeias laterais de ácidos graxos a lipoperóxidos, danificando proteínas de membrana e, assim afetar vários processos fisiológicos pela alteração da estrutura da membrana, tais como a permeabilidade, a fluidez e a função (Meerson et al., 1982; Halliwell & Gutteridge, 1990; Halliwell, 1992; 1994). A LPO produz aldeídos, gases hidrocarbonados e vários resíduos químicos, como o malondialdeído (MDA), dienos conjugados, acroleína e 4-OH-2-*trans*-nonenal (HNE). Assim, a peroxidação lipídica pode ser estimada pela medida de seus produtos e é utilizada para medir indiretamente a produção de RLs (Punchard & Kelly, 1996). Vários estudos têm utilizado a técnica de TBARS como medida indireta de liperoxidação (Fighera et al., 2003; Malfatti et al., 2003; Marisco et al., 2003; Royes et al., 2003; Ribeiro et al., 2005). O TBARS é um método que mede a peroxidação de lipídeos pela reação do ácido tiobarbitúrico com o MDA, que é um biomarcador de estresse oxidativo e, é um dos últimos produtos liberados no processo de LPO e causa dano celular (Brown & Kelly, 1996). De fato, estudos mostraram que a LPO também está envolvida em alterações na atividade da bomba de Na⁺ e K⁺ (Morel et al., 1998; Jain & Lim 2001; Kaur et al., 2001).

II.2.4.3. Na^+ , K^+ -ATPase

A Na^+ , K^+ -ATPase é uma enzima de membrana plasmática responsável por manter a homeostase celular. Esta enzima utiliza adenosina trifosfato (ATP) para exportar 3 íons Na^+ para o meio extracelular e importar 2 íons K^+ para o meio intracelular, e Mg^{2+} como cofator (Jorgensen, 1986).

A atividade da Na^+ , K^+ -ATPase pode ser regulada por vários fatores, entre eles estão os glicosídeos cardíacos como a ouabaína e a digoxina (Rose & Valdes, 1994) e algumas condições patológicas, como as doenças cardiovasculares, metabólicas e neurológicas (Clerico Et Al., 1990; El-Mallakh et al., 1993; Smith et al., 1993). Além disso, a atividade da Na^+ , K^+ -ATPase é modulada por agentes que ativam a proteína quinase G, como o GMPc, NO e CO, assim como por fosforilação/desfosforilação e pela proteína quinase C (PKC) (Muriel and Sandoval, 2000; Muriel et al., 2003; Barriviera et al., 2005).

Assim, como foi citado anteriormente, pode-se afirmar que a bomba de sódio é fundamental para a manutenção do potencial de membrana de repouso e para a propagação do impulso nervoso. O mau funcionamento desta enzima ocasiona um aumento ou uma diminuição da excitabilidade neuronal, dependendo do grau de inibição apresentado (Grisar et al., 1983).

Neurônios epilépticos exibem oscilações no potencial de membrana, com prolongadas despolarizações, hiperpolarizações e disparos neuronais repetitivos. Estas alterações podem ser decorrentes de danos na permeabilidade da membrana ou de mau funcionamento do sistema de transporte de cátions através da membrana (Harmony et al., 1968). Em pacientes epilépticos, observa-se um decréscimo da atividade da Na^+ - K^+ -ATPase no tecido cerebral (Grisar et al., 1986). De acordo com alguns autores, a atividade da Na^+ - K^+ -ATPase em córtex epiléptico pode estar reduzida, resultando em falha na remoção do Na^+ intracelular e K^+ do espaço extracelular (Pedley et al., 1975; Fisher et al., 1976) e facilitando a propagação da onda de despolarização (Grisar et al., 1986). Por outro lado, Bignami e colaboradores (1966) encontraram uma atividade aumentada da Na^+ - K^+ -ATPase em modelos de epilepsia.

Existem algumas evidências de que os radicais livres podem estar relacionados com a morte neuronal (Dawson & Dawson, 1996) e com a inativação da Na^+ - K^+ -ATPase, uma vez que a produção de radicais livres se dá principalmente durante a reperusão em cérebros isquemiados (Mishra et al., 1989; Huang et al., 1992). Como a Na^+ - K^+ -ATPase é uma

proteína integral de membrana, ela é um alvo fácil ao ataque dos radicais livres na membrana lipídica, principalmente no cérebro, uma estrutura rica em ácidos graxos poliinsaturados, os quais são altamente suscetíveis à LPO. Pierre e colaboradores (1999) mostraram que mudanças na atividade da Na^+, K^+ -ATPase são acompanhadas por aumento do nível de MDA, um produto final da LPO.

Além disso, foi demonstrado que o tratamento com ascorbato previne a inibição da Na^+, K^+ -ATPase e reduz a carbonilação protéica em um modelo experimental de epilepsia (Oliveira et al., 2004). De fato, o tratamento com antioxidantes, como o GSH, é capaz de prevenir a inibição da Na^+, K^+ -ATPase induzida pelo ácido glutárico e metilmalônico *in vitro* (Wyse et al., 2000; Kolker et al., 2002). Interessantemente, Shaheen e colaboradores (1996) observaram uma correlação positiva entre o aumento da LPO (induzida por hipóxia) e a ativação da Na^+, K^+ -ATPase e enzimas antioxidantes (GSH e SOD). Estes achados sugerem que os RLs podem modular a atividade da Na^+, K^+ -ATPase de maneira complexa, causando tanto inibição como ativação da enzima.

II.2.5. Relação das Espécies Reativas e Erros Inatos do Metabolismo

Há várias evidências que mostram o envolvimento da geração de espécies reativas em várias doenças neurodegenerativas e o aumento dos parâmetros do estresse oxidativo no cérebro desses pacientes, incluindo níveis aumentados de MDA, HNE e oxidação protéica de grupos carbonil e 3-nitrotirosina, assim como concentrações reduzidas dos antioxidantes não-enzimáticos GSH e ascorbato e das enzimas antioxidantes CAT e GSH-Px (Jenner and Olanow, 1996; Liu et al., 1999; Perry et al., 2003). Além disso, estudos têm mostrado a relação do estresse oxidativo com um considerável número de erros inatos do metabolismo, incluindo as acidemias glutárica tipo I (GA-I), propiônica e metilmalônica (Fighera et al., 1999; 2003; Oliveira Marques et al., 2003; Royes et al., 2005).

II.3. Erros Inatos do Metabolismo

Erros inatos do metabolismo (EIM) são distúrbios hereditários, resultado de deficiências em atividades enzimáticas, o que ocasiona um bloqueio de diversas rotas metabólicas. Esse bloqueio, além de induzir um acúmulo de substâncias tóxicas e/ou a falta de

substâncias essenciais, pode gerar distúrbios no desenvolvimento físico e mental (Fenton & Rosenberg, 1995). No início do século XX, Archibald Garrod empregou o termo EIM para se referir às situações clínicas que ele acreditou serem conseqüentes de defeitos em vias metabólicas. A primeira doença estudada foi a alcaptonúria, que leva à artrite e se caracteriza, bioquimicamente, pelo aumento da excreção de ácido homogentísico. Atualmente, o termo EIM se aplica a um grupo de doenças geneticamente determinadas, e que, geralmente, ocasiona deficiência em alguma atividade enzimática em uma via metabólica que está envolvida na síntese (anabolismo), transporte ou na degradação (catabolismo) de uma substância. A medida que se aprofunda o conhecimento científico, aumenta o número de erros inatos conhecidos, que hoje ultrapassam 500.

Apesar de serem eventos raros, os EIM representam um problema de saúde importante e seu diagnóstico, freqüentemente, se constitui em desafio para o clínico. Em algumas populações e grupos étnicos isolados, certos erros do metabolismo, bastante raros na população geral, podem ser extremamente freqüentes. Como exemplos, temos as doenças de Tay-Sachs e Gaucher entre os judeus originários do Leste europeu, conhecidos como “ashquenazim”, e a tirosinemia tipo I nos canadenses de ascendência francesa. A consangüinidade é um fator que aumenta consideravelmente o risco de qualquer doença genética de herança recessiva, inclusive os EIM.

Frequência estimada de alguns erros inatos do metabolismo	
Fenilcetonúria (caucasianos)	1/15.000
Acidemia glutárica tipo I	1/30.000
Homocistinúria	1/100.000
Acidemia metilmalônica	1/100.000

Em 1980, Chalmers e colaboradores observaram uma prevalência maior de acidemias orgânicas do que de aminoacipatias, até então os EIM mais estudados, em pacientes hospitalizados. De fato, em função dos progressos feitos no campo do diagnóstico dos erros

inatos do metabolismo, evidenciou-se que as acidemias orgânicas são, realmente, os erros inatos mais frequentes na população (Goodman & Frerman, 2001; Wajner et al., 2001).

II.4. Acidemia Glutárica

A acidemia glutárica tipo I (AG-I) é um erro inato do metabolismo que foi descrito pela primeira vez por Goodman e colaboradores em 1977. Esta acidemia é caracterizada bioquimicamente pelo aumento de AG, glutacônico e 3-OH-glutárico (3-OH-AG) no sangue, urina e no cérebro dos pacientes afetados, devido à deficiência na atividade da enzima glutaril-CoA desidrogenase (E.C 1.3.99.7) (Goodman et al., 1996). Esta enzima mitocondrial está envolvida na degradação dos aminoácidos L-triptofânio, L-hidróxi-lisina e da L-lisina, e converte glutaril-CoA em crotonil-CoA (Goodman & Frerman, 2001- Figura 11).

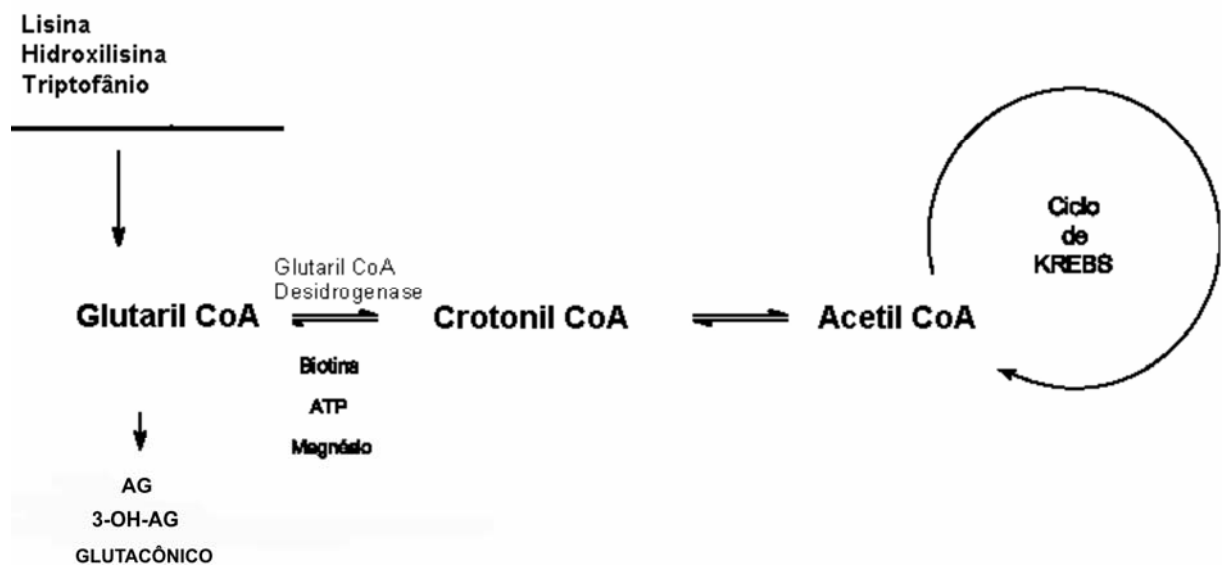


Figura 11. Metabolismo da enzima glutaril-CoA desidrogenase: enzima responsável pela conversão do glutaril CoA a crotonil CoA na rota de degradação dos aminoácidos lisina, hidróxi-lisina e triptofânio (Adaptado de Goodman & Frerman, 2001).

O grau de deficiência da enzima não está correlacionado com a intensidade dos sintomas apresentados pelos pacientes, assim como a excreção do AG pode ser normal em pacientes que apresentam sintomas graves. Entretanto, a produção aumentada de AG leva à acidose metabólica (Goodman & Frerman, 2001).

Os sinais e sintomas da doença variam em gravidade, de acordo com a idade que se instala o distúrbio metabólico (Kölker et al., 2000). Os sinais clínicos iniciam de maneira súbita, geralmente entre 2 a 37 meses de idade, após um período de desenvolvimento normal (Goodman & Frerman, 2001). Entretanto a macrocefalia, um dos achados clínicos mais frequentes, geralmente está presente ao nascimento (Goodman & Frerman, 2001). A concentração de AG no cérebro dos pacientes afetados é de 1.04 -21 mmol/g e de 0.3-0.7 mmol/g para o 3-OH-AG (Goodman et al., 1977).

Patologicamente esta acidemia é caracterizada principalmente por degeneração estriatal (Kylerman et al., 1994; Goodman et al., 1996) e os pacientes não tratados apresentam lesão irreversível de regiões do cérebro como o estriado e o córtex, resultando em discinesia e distonia muscular (Figuras 12 e 13). O tônus muscular apresenta-se geralmente comprometido, e a hipotonia se acentua após crises de descompensação metabólica. As manifestações neurológicas progredem lentamente com as crises encefalopáticas (convulsões e coma) (Hoffmann et al., 2001; Barreiro et al., 2004).

O quadro laboratorial caracteriza-se, principalmente, por acidose metabólica, hipercetonemia, hiperamonemia, hipoglicemia, neutropenia e trombocitopenia (Goodman & Frerman, 2001).



Figura 12. Movimentos distônicos de membros inferiores (extraído de Barreiro et al., 2004).



Figura 13. Discinesia facial (extraído de Barreiro et al., 2004).

Exames de ressonância magnética nuclear e tomografia computadorizada do cérebro dos pacientes mostram dilatação dos ventrículos laterais, atrofia cortical e degeneração dos núcleos caudado e putâmen (Figura 14 - Hoffmann et al., 1991; Twomey et al., 2003).

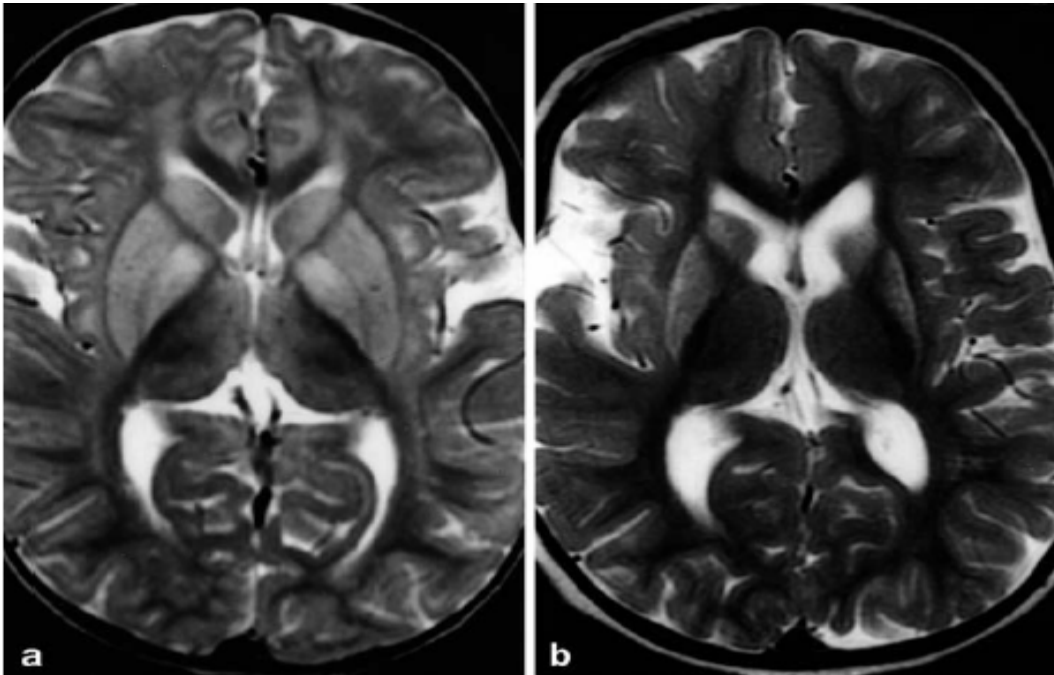


Figura 14. Ressonância nuclear magnética de crânio: a) aumento da intensidade do sinal nos núcleos caudato e putamen; b) dilatação de ventrículos cerebrais (extraído de Twomey et al., 2003).

Embora os sintomas neurológicos sejam predominantes, a causa da degeneração neuronal, principalmente dos gânglios da base, permanece desconhecida (Goodman & Frerman, 2001). Entretanto, foi demonstrado que o AG é tóxico em culturas neuronais (Whetsel et al., 1984), e que a degeneração estriatal poderia ser devido à ação tecidual direta do ácido ou de outro metabólito da rota afetada (Goodman & Frerman, 2001).

II.4.1. Excitotoxicidade na Acidemia Glutárica

Embora as alterações neurológicas sejam predominantes na AG-I, pouco se sabe sobre o mecanismo pelo qual o ácido glutárico é neurotóxico. Estudos mostraram que a administração intraestriatal de AG e 3-OH-AG induzem convulsões em ratos por mecanismos GABAérgicos e glutamatérgicos (Lima et al., 1998; de Mello et al., 2001) e que o AG inibe a recaptção de

glutamato em sinaptossomas de ratos (Porciúncula et al., 2000), sugerindo a participação de eventos excitotóxicos nas alterações neurológicas características da AG-I.

II.4.2. Modulação do Sistema GABAérgico

Um dos primeiros mecanismos propostos de fisiopatologia da AG-I foi baseado na inibição competitiva da glutamato descarboxilase (EC 4.1.1.15), enzima que catalisa a conversão do glutamato a GABA, pelo AG (K_i : 1.3×10^{-3} M), 3-OH-AG e ácido glutacônico (Stokke et al., 1976), sugerindo que o desequilíbrio na produção de GABA poderia ser uma das causas da neurodegeneração apresentada pelos pacientes glutaricoacidêmicos (Wajner et al., 2004). Entretanto, a redução nas concentrações de GABA no estriado foi descrita somente em um paciente com AG-I (Leibel et al., 1980). Embora esses resultados revelem um envolvimento do sistema GABAérgico nas alterações neurológicas presentes na AG-I, estes dados não podem determinar se a causa dessa redução é devido à perda dos neurônios GABAérgicos estriatais durante as crises encefalopáticas, ou se é devido à redução na produção de GABA nos gânglios basais (Wajner et al., 2004).

Lima e colaboradores (1998) mostraram que a injeção intraestriatal de AG induz convulsões em ratos, e que elas são atenuadas pela pré-administração de muscimol, um agonista de receptores GABA_A, sugerindo a participação dos receptores GABAérgicos nas convulsões induzidas por aquele ácido orgânico. De fato, foi evidenciado o envolvimento do sistema GABAérgico em um modelo experimental de epilepsia, desde que a redução do conteúdo de GABA ou a inibição da glutamato descarboxilase poderia, além de facilitar o aparecimento de convulsões, estar relacionado com a produção de EAO (Halliwell e Guteridge, 1999). Além disso, estudos mostraram o envolvimento das EAO nas convulsões induzidas por antagonistas de receptores GABA_A (Rauca et al., 1999; Gupta et al., 2003), uma vez que essa atividade epileptiforme foi inibida por antioxidantes como a glutatona (Abe et al., 2000), α -tocoferol e catalase (Kaayci et al., 2002).

II.4.2. Modulação do Sistema Glutamatérgico

Enquanto o 3-OH-AG induz dano neuronal devido à ativação de receptores NMDA (Kolker et al., 2000; 2001), inibição dos complexos II e IV da cadeia respiratória e depleção de fosfato de creatina (Ullrich et al., 1999), os efeitos tóxicos do AG ainda não foram esclarecidos

(Kolker et al., 2000; Bjugstad et al., 2001). Estudos mostraram que o AG (1-10 mM) é capaz de inibir a captação de glutamato em sinaptossomas (Bennet et al., 1973; Porciúncula et al., 2000) e a ligação desse neurotransmissor aos seus transportadores no córtex cerebral de ratos (Porciuncula et al., 2000). Estes dados sugerem que a inibição da captação de glutamato em sinaptossomas está provavelmente associada com a ligação do AG aos sítios de transporte daquele neurotransmissor. Entretanto, o AG em baixas concentrações (1-100 nM) estimula a ligação do glutamato aos receptores AMPA e metabotrópicos, mas não ao receptor glutamatérgico do subtipo N-metil-D-aspartato (NMDA) e de cainato no córtex cerebral de ratos (Porciúncula et al., 2004). Estes dados estão de acordo com o estudo de Lima e colaboradores (1998) que mostraram que o comportamento rotacional induzido pela administração intraestriatal de AG em ratos é prevenido por um antagonista de receptores AMPA, o DNQX, mas não por MK-801, um antagonista do receptor NMDA. O AG pode causar lesão em culturas corticoestriatais antes da sinaptogênese, ao contrário dos ácidos quinolínico e cainato, que necessitam de sinapses estabelecidas para exercerem seus efeitos excitotóxicos (Whetsell and Schwarcz 1983). Estes estudos sugerem um papel importante na expressão e função de subunidades específicas dos receptores de glutamato na neuropatogênese da AG-I.

Além disso, a inibição do complexo II da cadeia respiratória e a inibição da Na^+, K^+ -ATPase pelo AG (demonstradas *in vitro*) podem causar déficit energético e ativação secundária dos receptores glutamatérgicos (Kölker et al., 2002).

Contudo, ainda não está definido se uma disfunção dos sistemas GABAérgico e glutamatérgicos pode estar envolvida com as convulsões e a lesão estriatal evidenciadas nos pacientes com acidemia glutárica e, se esses eventos podem estar relacionados com a formação de espécies reativas.

II.5. Excitotoxicidade, formação de espécies reativas e convulsões

Apesar da transmissão GABAérgica e glutamatérgica serem fundamentais para os processos fisiológicos, sabe-se que um desequilíbrio nos neurotransmissores inibitório e excitatório, pode favorecer uma ativação supra-fisiológica dos receptores glutamatérgicos causando morte neuronal e um aumento na produção de espécies reativas. Esse processo é chamado de excitotoxicidade (Fenton & Rosenberg, 1995; Patel, 2004).

O termo excitotoxicidade foi inicialmente usado para descrever um aumento na ativação de receptores glutamatérgicos via administração de altas doses de glutamato exógeno (Olney & Ho, 1970). Após a descoberta de que antagonistas glutamatérgicos poderiam

proteger contra a perda neuronal induzida por diversos insultos neurológicos, como isquemia e hipóxia, passou-se a admitir que o glutamato endógeno pudesse ser mediador de processos excitotóxicos quando em altas concentrações na fenda sináptica (Obrenovitch, 1999; Obrenovitch et al, 2000).

A neurotoxicidade induzida pelo glutamato pode ter como causa: i) uma redução na transmissão GABAérgica; ii) aumento na concentração de glutamato no meio extracelular (aumento na liberação ou redução da captação); iii) uma hipersensibilidade dos receptores ao glutamato devido a uma perda na seletividade iônica, aumento na densidade ou anormalidades na modulação; e/ou iv) deficiência no metabolismo energético e nas defesas antioxidantes (Rothstein et al, 1992; Battaglioli et al, 1993; Greene & Greenamyre, 1996; Robinson & Dowd, 1997).

Neste contexto, uma estimulação excessiva de receptores glutamatérgicos, induz a perda do equilíbrio do Ca^{2+} intracelular. O aumento da concentração de Ca^{2+} intracelular provoca um aumento na produção de RLs, disfunção mitocondrial, e conseqüente diminuição na produção de energia (Gunter et al, 1994; Dugan et al, 1995; Coyle & Puttfarcken, 1993). Nesse contexto, a excitotoxicidade também tem sido relacionada a um aumento na produção de espécies reativas (Patel, 2004).

Estudos mostraram que algumas acidemias orgânicas, principalmente àquelas associadas à disfunção mitocondrial, estão relacionadas com a produção de RLs e a inibição de várias enzimas importantes para o metabolismo energético, como a aconitase e a Na^+, K^+ -ATPase (Castro et al., 1994; Radi et al., 1994; Schapira et al., 2002; Wyse et al., 2002). Há evidências de que a depleção energética induzida por alguns ácidos orgânicos, como MMA e AG, desencadeie a despolarização neuronal e o dano celular por falência na atividade de ATPases de membranas (McLaughlin et al, 1998; Silva et al., 2000; Malfatti et al., 2003). De fato, a depleção energética aumenta a liberação de glutamato não só por mecanismos dependentes de cálcio (por despolarização da membrana), mas também pela inibição e/ou reversão de mecanismos de recaptção deste aminoácido excitatório na pré-sinapse e nas células gliais, levando a um aumento de glutamato na fenda sináptica (Madl & Burgesser, 1993) e, a ativação secundária dos receptores glutamatérgicos subtipo NMDA e AMPA/cainato (Zeevalk et al., 1992, 1998).

O GABA também pode ter um papel crucial na despolarização neuronal e formação de RLs. O bloqueio do receptor GABA_A resulta em uma redução do influxo de íons Cl^- e facilita a despolarização da membrana e, assim, o influxo de Ca^{2+} através de canais associados ao receptor NMDA (Sankar et al., 1997). A despolarização da membrana pós-sináptica leva à

saída do íon Mg^{2+} , que bloqueia o canal do receptor NMDA de maneira dependente de voltagem, e permite a entrada de íons Na^+ e Ca^{2+} para o meio intracelular (McDonald & Schoepp, 1993). O dano excitotóxico primário é desencadeado pela entrada de Na^+ através de receptores ionotrópicos do subtipo AMPA/Kainato (Chan et al, 1979). O aumento de Ca^{2+} , via ativação de receptores do subtipo NMDA, leva à ativação de enzimas dependentes deste íon, e que estão envolvidas na produção de radicais livres como xantina oxidase (Said et al., 2000), fosfolipase C (Umemura et al., 1992) e ciclooxigenase (Pepicelli et al., 2005), calcineurina (Armstrong, 1989; Snyder & Sabatini, 1995) e óxido nítrico sintetase, que produz óxido nítrico (NO^*) (Snyder & Brecht, 1992). O NO^* pode interagir com radicais superóxido (O_2^*) e formar peroxinitrito ($ONOO^*$). Este radical pode difundir-se para o meio intra, ou extracelular e então promover a oxidação de lipídios, proteínas e DNA (Beckman et al., 1990; Almeida et al., 1998), que estão associados ao aparecimento de convulsões e morte celular.

Vários ácidos orgânicos são capazes de induzir estresse oxidativo e o aparecimento de convulsões. Entre eles podemos citar os ácidos metilmalônico, 3-OH-AG e AG (Lima et al., 1998; Figuera et al., 1999, 2003; de Mello et al., 2001; Oliveira Marques et al., 2003) (Figura 15).

De fato, o AG aumenta a produção de espécies reativas e reduz a atividade da glutatona peroxidase no cérebro de ratos *in vitro* (Oliveira Marques et al., 2003). Evidências adicionais da neurotoxicidade induzida pelo AG vêm dos estudos que mostraram que a glutatona, um agente antioxidante, previne a produção de espécies reativas e a redução na atividade da Na^+,K^+ -ATPase induzidos por aquele ácido no SNC de ratos (Kolker et al., 2002).

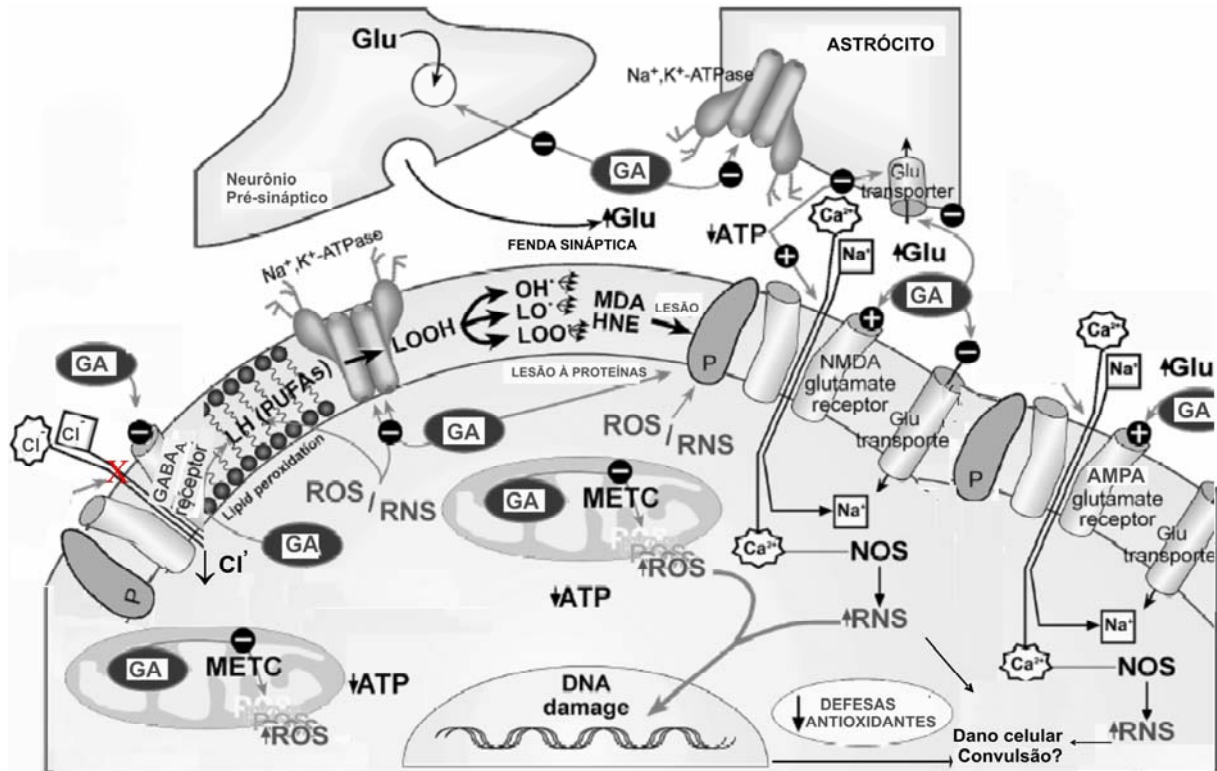


Figura 15. Mecanismos sugeridos de neurodegeneração induzidos pelo ácido glutâmico. O acúmulo de AG pode causar dano celular por três mecanismos neurotóxicos: falência energética, excitotoxicidade e estresse oxidativo. O AG pode ativar, direta ou indiretamente, os receptores glutamatérgicos, induzir a geração de espécies reativas do oxigênio (ROS – *reactive oxygen species*) e de nitrogênio (RNS – *reactive nitrogen species*) e reduzir os níveis das defesas antioxidantes, resultando na oxidação de lipídeos (PUFAs – *polyunsaturated fatty acids*), proteínas (P) e dano ao DNA. O AG é capaz de inibir, também, a Na^+, K^+ -ATPase (enzima importante para o metabolismo energético) e a cadeia de transporte mitocondrial (METC- *mitochondrial electron transfer chain*), resultando em redução dos níveis de ATP e no aumento da produção de ROS. Estes eventos causam despolarização neuronal e alterações nos gradientes iônicos. A despolarização provoca a liberação de glutamato armazenado nas vesículas sinápticas e a perda do gradiente leva a inibição e/ou reversão dos transportadores de glutamato a nível glial e neuronal. O aumento de glutamato na fenda sináptica e a falência energética, que também atinge a membrana pós-sináptica, induz a despolarização, primeiramente, por ativação dos receptores AMPA e aumento dos níveis de Na^+ e Ca^{2+} , deslocando assim, o Mg^{2+} presente no canal do receptor NMDA e favorecendo o influxo de Ca^{2+} para o meio intracelular. A inibição dos receptores GABA_A , pelo AG, reduz o influxo de Cl^- intracelular e também facilita o influxo de Ca^{2+} através de canais associados ao receptor NMDA, diminuindo o limiar de disparo neuronal e favorecendo a formação de ERs e as convulsões.

Contudo, ainda são necessários estudos complementares para definir o papel das EAO nos processos fisiológicos durante o estresse oxidativo induzidos por agentes convulsivantes. Além disso, dada a escassez de medidas terapêuticas efetivas contra as convulsões apresentadas por pacientes com acidemia glutárica, evidencia-se a importância da busca de novos compostos e do estudo do seu mecanismo de ação (Brunbech & Sabers, 2002). Uma das principais tendências das investigações é a pesquisa de novas drogas antiepilépticas com propriedades neuroprotetoras (Meldrum, 2001). Estudos recentes mostram a eficácia de algumas substâncias com propriedades antioxidantes na terapia das convulsões. Estes relatos demonstram sucesso na hipótese do papel das espécies reativas na patogenia dos danos

excitotóxicos cerebrais, entre eles as convulsões (Champney et al., 1996; Kabuto et al., 1998). Portanto, a investigação se o GM1 é uma droga com este perfil, é importante não somente para a elucidação do papel deste gangliosídeo sobre a produção das espécies reativas, mas também para a identificação de uma terapia adjuvante para o tratamento das convulsões.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

III. OBJETIVOS ESPECÍFICOS - ARTIGO I

O artigo I teve os seguintes objetivos:

1. Investigar o efeito da administração sistêmica de GM1 sobre a atividade das enzimas antioxidantes: CAT, SOD e GSH-Px, assim como sobre a quimiluminescência espontânea e TRAP no córtex de ratos *ex vivo*;
2. Avaliar se o GM1 altera a atividade da CAT e quimiluminescência espontânea *in vitro*;

ARTIGO I

Monosialoganglioside Increases Catalase Activity in Cerebral Cortex of Rats

MICHELE RECHIA FIGHERA^a, JULIANA SARTORI BONINI^a, ROBERTO FRUSSA-FILHO^b, CARLOS SEVERO DUTRA-FILHO^c, MARTINE E. KIENZLE HAGEN^c, MARIBEL ANTONELLO RUBIN^a and CARLOS FERNANDO MELLO^{a,*}

^aDepartamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil; ^bDepartamento de Farmacologia, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, 04023-900, Brazil; ^cDepartamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 90035-003, Brazil

Accepted by Professor José Vina

(Received 22 October 2003; In revised form 21 January 2004)

Monosialoganglioside (GM1) is a neuroprotective agent that has been reported to scavenge free radicals generated during reperfusion and to protect receptors and enzymes from oxidative damage. However, only a few studies have attempted to investigate the effects of GM1 on enzymatic antioxidant defenses of the brain. In the present study, we evaluate the effects of the systemic administration of GM1 on the activity of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GSH-Px), and on spontaneous chemiluminescence and total radical-trapping potential (TRAP) in cerebral cortex of rats *ex vivo*. The effects of GM1 on CAT activity and spontaneous chemiluminescence *in vitro* were also determined.

Animals received two injections of GM1 (50 mg/kg, i.p.) or saline (0.85% NaCl, i.p.) spaced 24h apart. Thirty minutes after the second injection the animals were sacrificed and enzyme activities and spontaneous chemiluminescence and TRAP were measured in cell-free homogenates. GM1 administration reduced spontaneous chemiluminescence and increased catalase activity *ex vivo*, but had no effect on TRAP, SOD or GSH-Px activities. GM1, at high concentrations, reduced CAT activity *in vitro*. We suggest that the antioxidant activity of GM1 ganglioside in the cerebral cortex may be due to an increased catalase activity.

Keywords: GM1 ganglioside; Total radical-trapping antioxidant potential; Antioxidant enzymes; Spontaneous chemiluminescence

INTRODUCTION

Gangliosides comprehend a group of glycosphingolipids characterized by the presence of one or more

sialic acid residues in the oligosaccharide chain, which are synthesized in the Golgi apparatus and then transported and incorporated into the plasma membrane.^[1] Gangliosides have been found virtually in every vertebrate tissue, particularly in the brain, where they represent about 10% of the lipid content.^[2] It has been reported that gangliosides play a modulatory role in different events associated with adaptive functions^[3–6] neuronal plasticity^[7,8] memory formation^[9–12] and neuroprotection against various neurotoxic agents or conditions, such as excitotoxic amino acid exposure, anoxia/ischemia, Parkinson's and Alzheimer's diseases,^[13–17] accompanied by an apparent absence of side effects. Accordingly, GM1 inhibits lipid peroxidation and intracellular calcium overloading,^[15,17,18] and it has been argued that GM1 may directly scavenge free radicals generated during reperfusion and protect receptors and enzymes from oxidative damage.^[2,19] In addition, we have recently demonstrated that GM1 attenuates methylmalonate-induced convulsions and thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) generation and increases ascorbic acid levels in the striatum of the rats *ex vivo*, further supporting a possible antioxidant role for gangliosides in the central nervous system (CNS).^[17]

Considering that superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GSH-Px) constitute the major intracellular antioxidant protection system of the CNS, and that little is known about

*Corresponding author. Fax: +55-55-2208031. E-mail: cf.mello@smail.ufsm.br

the effects of GM1 on these antioxidant enzymes, we decided to investigate whether GM1 alters SOD, CAT and GSH-Px activities *ex vivo*. Since GM1 administration altered CAT activity and spontaneous chemiluminescence *ex vivo*, the effects of GM1 on catalase activity and spontaneous chemiluminescence *in vitro* were also determined.

MATERIALS AND METHODS

Reagents and Equipment

All chemicals were purchased from Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA, except for the RANSOD kit, which was purchased from RANDOX, and GM1 ganglioside, which was kindly donated by TRB Pharma. Chemiluminescence and total radical-trapping potential (TRAP) were assayed using a beta liquid scintillation spectrometer (Tricarb 2100TR and Wallac model 1409, respectively) and enzyme activities were measured with a double-beam spectrophotometer with temperature control.

Animals

Adult male Wistar rats (105–120 days, 350–380 g) bred in the animal house of the UFRGS, were used. Rats had free access to water and to a standard lab chow (Germani, Porto Alegre, RS, Brazil). Temperature was maintained at $24 \pm 1^\circ\text{C}$, with a 12/12 h light/dark cycle. The "Principles of laboratory animal care" (NIH publication no 85-23, revised 1985) were followed throughout the experiments.

Treatment and Tissue Preparation *Ex Vivo*

Animals received two injections of GM1 (50 mg/kg, *i.p.*) or saline (NaCl 0.9%, *i.p.*) spaced 24 h apart. Thirty minutes after the second GM1 or saline injection the animals were killed by decapitation and the brain was immediately removed. This experimental protocol of GM1 administration has been shown to be effective in decreasing methylmalonate-induced TBARS production in rat striatum.^[17] The cerebral cortex was dissected, weighed and homogenized in the incubation medium specified for each technique and centrifuged at 1000g for 10 min at 4°C . The supernatant was immediately used for the measurements.

Spontaneous Chemiluminescence

Samples were assayed for chemiluminescence in a dark room by the method of Gonzalez-Flecha *et al.*^[20] Incubation flasks contained 3.5 ml of medium consisting of 20 mM sodium phosphate, pH 7.4, and 140 mM KCl. The background

chemiluminescence was measured, and 0.5 ml of cell-free homogenate immediately added. Chemiluminescence was measured for 30 min at room temperature. The background chemiluminescence was subtracted from the total value and the results are presented as cps/mg of protein. *In vitro* experiments were carried out as described above, except that cell-free cerebral cortex homogenates were previously incubated for 1 h at 37°C in the absence or presence of GM1 (10^{-2} to 10^4 nM).

Total Radical-trapping Antioxidant Potential

TRAP represents the total antioxidant capacity of the tissue and was determined by measuring the luminol chemiluminescence induced by 2,2'-azo-bis(2-amidinopropane) (ABAP) at room temperature by the method of Lissi *et al.*^[21] Tissue was homogenized 1:10 (w/v) in 0.1 M glycine buffer (pH 8.6), and ABAP was added to the vial and the background chemiluminescence measured. Luminol was subsequently added to the vial and the chemiluminescence was measured again. The chemiluminescence value obtained in the presence of luminol was considered the initial value. Afterwards, Trolox or cerebral homogenates were added to the medium and chemiluminescence was measured until it reached the initial value. The induction time was considered as the time elapsed between adding Trolox or cerebral homogenates and the total recovery of initial chemiluminescence levels. The induction time is directly proportional to the antioxidant capacity of the tissue and was compared to the induction time of Trolox. The results are reported as nmol of Trolox/mg of protein. *In vitro* experiments were carried out as described above, except that cell-free cortex homogenates were previously incubated for 1 h at 37°C in the absence or presence of GM1 (10^{-2} to 10^4 nM).

Catalase Assay

CAT activity was assayed by the method of Aebi,^[22] which is based on the disappearance of H_2O_2 at 240 nm. Brain tissue was homogenized 1:10 (w/v) in 10 mM potassium phosphate buffer, pH 7.6. One unit of enzyme activity was defined as 1 μmol of hydrogen peroxide consumed per minute, and the specific activity reported as units/mg protein.

Superoxide Dismutase Assay

The assay of SOD activity was carried out with the RANSOD kit (Randox, USA), which is based on the formation of red formazan from the reaction of 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5-phenyltetrazolium chloride and superoxide radical. The inhibition of the produced chromogen is proportional to the activity of the SOD present in the sample.

A 50% inhibition was defined as one unit of SOD and specific activity reported as units/mg of protein.

Glutathione Peroxidase Assay

GSH-Px activity was measured according to Wendel,^[23] except for the concentration of NADPH, which was adjusted to 0.1 mM after previous tests performed in our laboratory. NADPH disappearance was monitored at 340 nm and one GSH-Px unit was defined as 1 μ mol of NADPH consumed per min and specific activity reported as units/mg of protein.

Protein Determination

Protein was measured by the method of Lowry *et al.*,^[24] using bovine serum albumin as standard.

Statistical Analysis

Data were analyzed by the Student's *t*-test or by one-way analysis of variance. *Post hoc* analysis was carried out by the Student-Newman-Keuls test, when appropriate.

RESULTS

Ex Vivo Experiments

Table I shows the effect of systemic GM1 administration on the spontaneous chemiluminescence and on the CAT activity of cerebral cortex of rats *ex vivo*. Statistical analysis revealed that GM1 administration reduced spontaneous chemiluminescence [$t(7) = 2.64$; $p < 0.05$] and increased CAT activity [$t(14) = 2.72$; $p < 0.01$] in cerebral cortex homogenates, as compared with saline.

Table II shows that the systemic GM1 administration had no effect on TRAP [$t(9) = 0.38$; $p > 0.05$], SOD [$t(12) = 1.83$; $p > 0.05$] and GSH-Px [$t(10) = 1.29$; $p > 0.05$] activities in cortex homogenates, as compared with saline.

In Vitro Experiments

Figure 1 shows the effect of GM1 on CAT activity *in vitro*. Statistical analysis revealed that high

TABLE I Effect of GM1 ganglioside (50 mg/kg, i.p.) on the spontaneous chemiluminescence (Chem) and catalase (CAT) activity in brain homogenates from rats *ex vivo*

	Chem (cps/mg protein)	CAT (unit/mg protein)
Saline	170 \pm 10.1	3.8 \pm 1.5
GM1	135 \pm 5.2*	5.2 \pm 1.5*

Data are mean SEM and $n = 9-10$ per group. Saline = NaCl 0.9%; GM1 = monosialoganglioside. * $p < 0.05$ compared with saline group (Student *t*-test).

TABLE II Absence of effect of GM1 ganglioside (50 mg/kg, i.p.) on total radical-trapping antioxidant potential (TRAP), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) activities in brain homogenates from rats *ex vivo*

	TRAP (nmol/mg protein)	SOD	GSH-Px
Saline	12.5 \pm 1.52	32.1 \pm 1.12	32.5 \pm 1.8
GM1	11.6 \pm 1.53	34.4 \pm 2.2	36.6 \pm 2.2

Data are mean SEM and $n = 6-7$ per group. Saline = NaCl 0.9%; GM1 = monosialoganglioside.

concentrations of GM1 (10^3 to 10^4 nM) in the incubation medium inhibited CAT activity *in vitro* [$F(7,21) = 6.8$; $p < 0.001$], as compared with saline. In contrast, GM1 had no effect on spontaneous chemiluminescence [$t(3) = 2.65$; $p > 0.05$] of cortex homogenates *in vitro* (data not shown).

DISCUSSION

In the present study, we show that GM1 administration increased CAT activity and reduced spontaneous chemiluminescence of cerebral cortex homogenates *ex vivo*. Conversely, GM1 ganglioside had no effect on SOD and GSH-Px activities and on total TRAP. Interestingly, GM1 ganglioside (10^3 to 10^4 nM) addition to the incubation medium reduced CAT activity *in vitro* and had no effect on spontaneous chemiluminescence *in vitro*, suggesting that GM1-induced CAT activation *ex vivo* is not due to a direct effect of the ganglioside on the enzyme.

The brain is particularly susceptible to oxidation by reactive species because of its dependency on aerobic metabolism, large content of polyunsaturated lipid in the mitochondrial and plasma membranes of brain cells and its low antioxidant defenses.^[25] Mitochondrial dysfunction and consequent ATP depletion are a major cause of oxidative stress and calcium homeostasis alterations^[26] in the CNS, ultimately producing

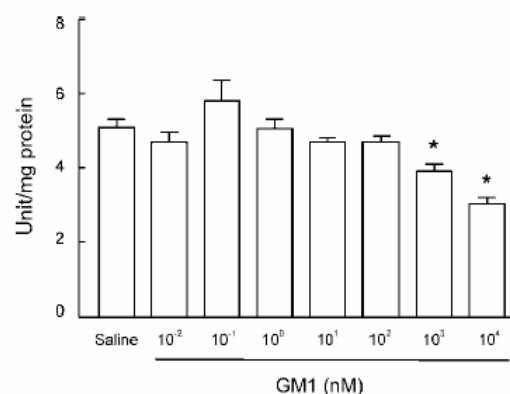


FIGURE 1 Effect of GM1 on catalase activity *in vitro*. Data are mean \pm SEM and $n = 6$ per group. * $p < 0.05$ compared with saline (Student-Newman-Keuls Test).

loss of cellular integrity and cell death. Indeed, various neurodegenerative disorders, including Parkinson, Huntington and Alzheimer's diseases have been associated with mitochondrial dysfunction, activation of excitotoxic mechanisms and free radical generation.^[26,27] The integrity and existence of an organism depend on proper cellular homeostatic regulation. Under normal physiological conditions, cellular homeostasis is incessantly challenged by stressors and, among them, are the products generated from oxygen metabolism. The cell detoxifies these free radicals via its own antioxidant defense system,^[26] which includes the antioxidant enzymes SOD, CAT and GSH-Px.^[28] In fact, most of the evidence for a protective role for antioxidant defenses in limiting injury in the CNS depends on the activation antioxidant enzymes like GSH-Px,^[26] SOD^[29,30] or CAT^[31] or both.^[32-36] Various factors may regulate the expression of antioxidant enzymes, such as copper deficiency,^[37] oxidative stress^[26] and neuronal growth factor (NGF) administration.^[31,38,39] In the CNS, NGF stimulates cellular resistance to oxidative stress, protects PC12 cells from the toxic effects of reactive oxygen species and increases CAT and GSH-Px mRNA levels in PC12 cells in a time- and dose-dependent manner.^[39,40] In addition to NGF, gangliosides, are also known to exert neurotogenic and neurotrophic effects both *in vitro* and *in vivo*^[41] and further increase the already elevated levels of catalase after ischemia in the cerebral cortex of rats.^[42] Exogenously administered gangliosides, particularly GM1, have been shown to stimulate neurite outgrowth in cell culture.^[43-46] Moreover, GM1 has been shown to potentiate the NGF-induced recovery of neurochemical markers following cortical devascularisation^[47] or others injuries,^[48] suggesting that it can be used as a useful tool to promote functional recovery of the CNS. It has been suggested that GM1 promotes neuronal survival by activating NGF receptor tyrosine kinase activity,^[49] what indicates that GM1 and NGF effects are closely related. Therefore, it may be speculated that the presently reported increase in CAT activity by GM1 involves an increased transcription of the enzyme, which is possibly mediated by neurotrophic factors. Indeed, the presently reported lack of activating effect of GM1 ganglioside on CAT activity *in vitro* supports the view that GM1 ganglioside activating effect on CAT depends on the cellular integrity of the system. This result matches previous studies from our group, since we have previously reported that the inhibitory effect of GM1 on methylmalonate-induced striatal TBARS generation depends on the cellular integrity of the system.^[17] Therefore, it is tempting to propose that the presently reported increase of CAT activity by GM1 underlies its antioxidant effects in the CNS, although a GM1-induced increase in the ascorbate content of the CNS has been also reported.^[17]

Although some of the antioxidant actions of GM1 (including the presently described increase in CAT activity) seem to depend on the cellular integrity of the system, their magnitude seem to afford important functional effects. For example, systemic administration of GM1, at lower doses than or the same doses as that used in the present study, was effective in inhibiting methylmalonate-induced convulsions^[17] as well as reserpine-induced orofacial movement^[6] in rats. Importantly, the physiopathogenesis of these behavioral phenomena have been extensively related to increased oxidative stress.^[50-55]

At last, it should be pointed out that CAT, due to its low activity in the CNS, has been considered a secondary enzyme in controlling free radical-induced damage,^[25] a fact that could diminish the relative importance of the presently reported GM1-induced increase of CAT activity as the mechanism underlying GM1-induced antioxidant action. On the other hand, it has been reported that local enzyme activities determine regional susceptibility to neurotoxic agents.^[56] Accordingly, highly immunoreactive cells for CAT 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. This finding indicates that CAT may be critical for a protective effect against oxidative stress under pathological conditions, such as ischemia-reperfusion injury.^[57] Further evidence for a critical role for CAT as a protective agent against oxidative stress in the CNS come from the studies that have demonstrated that inhibition of CAT activity increases Alzheimer's β -amyloid peptide neurotoxicity^[58] and that CAT activity is decreased, but SOD activity is unchanged, in brains of patients with dementia of Alzheimer type.^[59] Therefore, one might propose that CAT, due to its decreased activity in the brain, is a point of vulnerability in the cerebral antioxidant system, which has had its importance overlooked in the literature. We think that this is a matter of significant discussion, and that the relative importance of CAT activity as a determinant of the CNS susceptibility to reactive oxygen species is still to be established.

Acknowledgements

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) PronEx - MCT: 661061-1997-3 and FAP-ERGS. C.F. Mello, and M.R. Figuera and are the recipients of CNPq fellowships (grant number: 500120/2003-0). M.A. Rubin is the recipient of a CNPq fellowship (grant number: 500096/2003-1). GM1 ganglioside was kindly donated by TRB Pharma, the Brazilian representative of Fidia Research Laboratories.

References

- [1] Leeden, R.W. (1983) "Gangliosides", In: Lajtha, A., ed, *Handbook of Neurochemistry* (Plenum Press, New York), pp 41–90.
- [2] Maulik, N., Das, D.K., Gogineni, M., Cordis, G.A., Avrova, N. and Denisova, N. (1993) "Reduction of myocardial ischemic reperfusion injury by sialylated glycosphingolipids, gangliosides", *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **22**, 74–81.
- [3] Bellot, R.G., Camarini, R., Vital, M.A.B.F., Palermo-Neto, J., Leyton, V. and Frussa-Filho, R. (1996) "Monosialoganglioside attenuates the excitatory and behavioural sensitization effects of ethanol", *Eur. J. Pharmacol.* **313**, 175–179.
- [4] Bellot, R.G., Vital, M.A.B.F., Palermo-Neto, J. and Frussa-Filho, R. (1997) "Repeated monosialoganglioside administration attenuates behavioral sensitization to amphetamine", *Brain Res.* **747**, 169–172.
- [5] Vital, M.A.B.F., Frussa-Filho, R. and Palermo-Neto, J. (1995) "Effects of monosialoganglioside on dopaminergic supersensitivity", *Life Sci.* **56**, 2299–2307.
- [6] Vital, M.A.B.F., Frussa-Filho, R. and Palermo-Neto, J. (1997) "Effects of monosialoganglioside on a new model of tardive dyskinesia", *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **21**, 1169–1179.
- [7] Palermo-Neto, J., Frussa-Filho, R. and Vital, M.A.B.F. (1999) "Kinetic analysis of GM1 effects on haloperidol-induced dopaminergic supersensitivity", *Gen. Pharmacol.* **32**, 265–270.
- [8] Vital, M.A.B.F., Flório, J.C., Frussa-Filho, R., De Lucia, R., Tufik, S. and Palermo-Neto, J. (1998) "Effects of haloperidol and GM1 ganglioside treatment on striatal D₂ receptor binding and dopamine turnover", *Life Sci.* **62**, 1161–1169.
- [9] Silva, R.H., Felício, L.F., Nasello, G., Vital, M.A.B.F. and Frussa-Filho, R. (1996) "Effects of ganglioside GM1 on memory in senescent rats", *Neurobiol. Aging* **14**, 582–586.
- [10] Silva, R.H., Bellot, R.G., Vital, M.A.B.F. and Frussa-Filho, R. (1997) "Effects of long-term ganglioside GM1 administration on a new discriminative avoidance test in normal adult mice", *Psychopharmacology* **129**, 322–328.
- [11] Silva, R.H., Felício, L.F. and Frussa-Filho, R. (1999) "Ganglioside, GM1 attenuates scopolamine-induced amnesia in rats and mice", *Psychopharmacology* **141**, 111–117.
- [12] Silva, R.H., Bergamo, M. and Frussa-Filho, R. (2000) "Effects of neonatal ganglioside GM1 administration on memory in adult and old rats", *Pharmacol. Toxicol.* **87**, 120–125.
- [13] Zoli, M., Ruggeri, M., Zini, I., Grimaldi, R., Pich, E.M., Toffano, G., Fuxe, K. and Agnati, L.F. (1990) "Aspects of neural plasticity in the central nervous system-VI. Studies of the effects of gangliosides on brain metabolic lesions", *Neurochem. Int.* **16**, 469–478.
- [14] Carolei, A., Fieschi, C., Bruno, R. and Toffano, G. (1991) "Monosialoganglioside GM1 in cerebral ischemia", *Cerebrovasc. Brain Metab. Rev.* **3**, 134–157.
- [15] Phillis, J.W. and O'Regan, M.H. (1995) "GM1 Ganglioside inhibits ischemic release of amino acid neurotransmitters from rat cortex", *Neuroreport* **6**, 2010–2012.
- [16] Tajrine, G., Garofalo, L., Cuello, A.C. and Ribeiro-da-Silva, A. (1997) "Responses of cortical noradrenergic and somatostatinergic fibers and terminals to adjacent strokes and subsequent treatment with NGF and/or the ganglioside GM1", *J. Neurosci. Res.* **50**, 627–642.
- [17] Fighera, M.R., Bonini, J.S., Oliveira, T.G., Rocha, J.B.T., Dutra-Filho, C.S., Rubin, M.A. and Mello, C.F. (2003) "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.
- [18] Tanaka, K., Dora, E., Greenberg, J., Toffano, G. and Reivich, M. (1986) "Effect of the Ganglioside on cerebral metabolism, recovery kinetics of EcoG and histology during the recovery period following focal ischemia in cats", *Stroke* **17**, 1170–1178.
- [19] Tyurin, V.A., Kuznetsova, L.A., Tyurina, Y.Y., Erin, A.N., Avrova, N.F. and Kagan, V.E. (1991) "Role of Gangliosides in protection of beta-adrenoceptors against damage by lipid peroxidation in synaptosomal membranes", *Bull. Exp. Biol. Med. USSR* **111**, 779–783.
- [20] Gonzalez-Flecha, B., Llesuy, S. and Boveris, A. (1991) "Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle", *Free Radic. Biol. Med.* **10**, 93–100.
- [21] Lissi, E., Pascual, C. and Castilho, M.D. Del (1992) "Luminol luminescence induced by 2,2'-azo-bis (2-amidinopropane) thermolysis", *Free Radic. Res. Commun.* **17**, 299–311.
- [22] Aebi, H. (1984) "Catalase *in vitro*", *Methods Enzymol.* **105**, 121–126.
- [23] Wendel, A. (1981) "Glutathione peroxidase", *Methods Enzymol.* **77**, 325–332.
- [24] Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) "Protein measurement with Folin phenol reagent", *J. Biol. Chem.* **193**, 265–267.
- [25] Reiter, R.J. (1995) "Oxidative processes and antioxidant defense mechanisms in the aging brain", *FASEB J.* **9**, 526–553.
- [26] Cassarino, D.S. and Bennett, J.P. (1999) "An evaluation of the role of mitochondrial in neurodegenerative diseases: mitochondrial mutations and oxidative pathology, protective nuclear responses, and cell death in neurodegeneration", *Brain Res. Rev.* **29**, 1–25.
- [27] Beal, M.F. (2000) "Energetics in the pathogenesis of neurodegenerative diseases", *Trends Neurosci.* **23**, 298–304.
- [28] Onodera, K., Omoi, Nao-Omi, Fukui, K., Hayasaka, T., Shinkai, T., Suzuki, S., Abe, K. and Urano, S. (2003) "Oxidative damage of rat cerebral cortex and hippocampus, and changes in antioxidant defense systems caused by hyperoxia", *Free Radic. Res.* **37**, 367–372.
- [29] Troy, C.M. and Chelanski, M.L. (1994) "Downregulation of Cu-Zn superoxide dismutase cause apoptotic death in PC12 neuronal cells", *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **91**, 6384–6387.
- [30] Rothstein, J.D., Bristol, L.A., Hosler, B.A., Brown, R.H. and Kunel, R.W. (1994) "Chronic inhibition of superoxide dismutase produces apoptotic death of spinal neurons", *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **91**, 4155–4199.
- [31] Sampath, D., Holets, V. and Perz-Polo, J.R. (1995) "Effect of a spinal cord photolesion injury on catalase", *Int. J. Dev. Neurosci.* **13**, 645–654.
- [32] Chan, P.H. (1992) "Antioxidant-dependent amelioration of brain injury: role of Cu,Zn-superoxide dismutase", *J. Neurotrauma* **9**(Suppl. 2), S417–S423.
- [33] Farbiszewski, R., Chwiecko, M. and Ustymowicz, J. (1994) "The 21-aminosteroid U-74389G protects the antioxidant enzymes in the ischemia/reperfusion-induced rat brain damage", *Eur. J. Pharmacol.* **270**, 263–265.
- [34] Liu, D., Yang, R., Yan, X. and McAdoo, D.J. (1994) "Hydroxyl radicals generated *in vivo* kill neurons in the rat spinal cord: electrophysiological, histological, and neurochemical results", *J. Neurochem.* **62**, 37–44.
- [35] Truelove, D., Shuaib, A., Ijaz, S., Richardson, S. and Kalra, J. (1994) "Superoxide dismutase, catalase, and U78517F attenuate neuronal damage in gerbils with repeated brief ischemic insults", *Neurochem. Res.* **19**, 665–671.
- [36] Truelove, D., Shuaib, A., Ijaz, S., Ishaqzay, R. and Kalra, J. (1994) "Neuronal protection with superoxide dismutase in repetitive forebrain ischemia in gerbils", *Free Radic. Biol. Med.* **17**, 445–450.
- [37] Lai, C.C., Huang, W.H., Askari, A., Klevay, L.M. and Chiu, T.H. (1995) "Expression of glutathione peroxidase and catalase in copper-deficient rat liver and heart", *J. Nutr. Biochem.* **6**, 256–262.
- [38] Satoh, T., Yamagata, T., Ishikawa, E., Yamada, M., Uchiyama, Y. and Hatanaka, H. (1999) "Regulation of reactive oxygen species by nerve growth factor but not Bcl-2 as a novel mechanism of protection of PC12 cells from superoxide anion-induced death", *J. Biochem.* **125**, 952–959.
- [39] Yamagata, T., Satoh, T., Ishikawa, Y., Nakatani, A., Yamada, M., Ikeuchi, T. and Hatanaka, H. (1999) "Brain-derived neurotrophic factor prevents superoxide anion-induced death of PC12 cells stably expressing TrkB receptor via modulation of reactive oxygen species", *Neurosci. Res.* **35**, 9–17.
- [40] Sampath, D., Jackson, G.R., Werrbach-Perez, K. and Perez-Polo, J.R. (1994) "Effects of nerve growth factor on glutathione peroxidase and catalase in PC 12 cells", *J. Neurochem.* **62**, 2476–2479.
- [41] Hadjiconstantinou, M. and Neff, N.H. (1998) "GM1 ganglioside: *in vivo* and *in vitro* trophic actions on central neurotransmitters systems", *J. Neurochem.* **70**, 1335–1345.

- [42] Mahadik, S.P., Makar, T.K., Murthy, J.N., Ortiz, A., Wakade, C.G. and Karpiak, S.E. (1993) "Temporal changes in superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and catalase levels in primary and peri-ischemic tissue. Monosialoganglioside (GM1) treatment effects", *Mol. Chem. Neuropathol.* **18**, 1–14.
- [43] Doherty, P., Ashton, S.V., Skaper, S.D., Leon, A. and Walsh, F.S. (1992) "Ganglioside modulation of neural cell adhesion molecule and N-cadherin-dependent neurite outgrowth", *J. Cell Biol.* **117**, 1093–1099.
- [44] Ferrari, G., Fabris, M. and Gorio, A. (1983) "Gangliosides enhance neurite outgrowth in PC12 cells", *Brain Res.* **284**, 215–221.
- [45] Skaper, S.D., Katoh-Semba, R. and Varon, S. (1985) "GM1 ganglioside accelerates neurite outgrowth from primary peripheral and central neurons under selected culture conditions", *Brain Res.* **355**, 19–26.
- [46] Wu, G. and Ledeen, R.W. (1991) "Stimulation of neurite outgrowth in neuroblastoma cells by neuraminidase: putative role of GM1 ganglioside in differentiation", *J. Neurochem.* **56**, 95–104.
- [47] Cuello, A.C., Garofalo, L., Kenigsberg, R.L. and Maysinger, D. (1989) "Gangliosides potentiate *in vivo* and *in vitro* effects of nerve growth factor on central cholinergic neurons", *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* **86**, 2056–2060.
- [48] Vantini, G., Fusco, M., Bigon, E. and Leon, A. (1988) "GM1 ganglioside potentiates the effect of nerve growth factor in preventing vinblastine-induced sympathectomy in newborn rats", *Brain Res.* **448**, 252–258.
- [49] Ferrari, G. and Greene, L.A. (1996) "Prevention of neuronal apoptotic death by neurotrophic agents and ganglioside GM1: insights and speculations regarding a common mechanisms", *Perspect. Dev. Neurobiol.* **3**, 93–100.
- [50] Figuera, M.R., Queiroz, C.M., Stracke, M.P., Nin Brauer, M.C., González-Rodríguez, L.L., Frussa-Filho, R., Wajner, M. and de Mello, C.F. (1999) "Ascorbic acid and α -tocopherol attenuate methylmalonic acid-induced convulsion", *Neuroreport* **10**, 2039–2043.
- [51] Bergamo, M., Abílio, V.C., Queiroz, C.M.T., Barbosa-Júnior, H.N., Abdanur, L.R.A. and Frussa-Filho, R. (1997) "Effects of age on a new animal model of tardive dyskinesia", *Neurobiol. Aging* **18**, 623–629.
- [52] Calvente, P.R.V., Araújo, C.C.S., Bergamo, M., Abílio, V.C., D'Almeida, V., Ribeiro, R.D.A. and Frussa-Filho, R. (2002) "The mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid aggravates reserpine-induced oral dyskinesia in rats", *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **26**, 1–5.
- [53] Abílio, V.C., Vera, J.A.R., Ferreira, L.S.M., Duarte, C.R.M., Carvalho, R.C., Grassl, C., Martins, C.R., Torres-Leite, D., Bignotto, M., Tufik, S., Ribeiro, R.D. and Frussa-Filho, R. (2002) "Effects of melatonin on orofacial movements in rats", *Psychopharmacology* **161**, 340–347.
- [54] Bürger, M.E., Alves, A., Callegari, L., Athayde, F.R., Nogueira, C.W., Zeni, G. and Rocha, J.B.T. (2003) "Ebselen attenuates reserpine-induced orofacial dyskinesia and oxidative stress in rat striatum", *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **27**, 135–140.
- [55] Marisco, P.C., Ribeiro, M.C.P., Bonini, J.S., Lima, T.T.F., Mann, K.C., Brenner, G.M., Dutra-Filho, C.S. and Mello, C.F. (2003) "Ammonia potentiates methylmalonic acid-induced convulsions and TBARS production", *Exp. Neurol.* **182**, 455–460.
- [56] Davolio, C. and Greenamyre, J.T. (1995) "Selective vulnerability of the CA 1 region of hippocampus to the indirect excitotoxic effects of malonic acid", *Neurosci. Lett.* **192**, 29–32.
- [57] Moreno, S., Mugnaini, E. and Ceru, M.P. (1995) "Immunocytochemical localization of catalase in the central nervous system of the rat", *J. Histochem. Cytochem.* **43**, 1253–1267.
- [58] Milton, N.G.N. (2001) "Inhibition of catalase activity with 3-amino-triazole enhances the cytotoxicity of the Alzheimer's amyloid- β peptide", *Neurotoxicology* **22**, 767–774.
- [59] Gsell, W., Conrad, R., Hicketier, M., Sofic, E., Frolich, L., Wichart, I., Jellinger, K., Moll, G., Ransmayr, G. and Beckmann, H. (1995) "Decreased catalase activity but unchanged superoxide dismutase activity in brains of patients with dementia of Alzheimer type", *J. Neurochem.* **64**, 1216–1223.

IV. OBJETIVOS ESPECÍFICOS – ARTIGO II

O artigo II teve os seguintes objetivos:

3. Investigar se a administração sistêmica de GM1 protege contra as convulsões induzidas pelo AG;
4. Investigar o efeito da injeção intraestriatal de AG *ex vivo*, assim como, da adição de AG no meio de incubação *in vitro*, sobre a carbonilação protéica e produção de TBARS no estriado de ratos.
5. Investigar o efeito da administração de GM1 na carbonilação protéica e na produção de TBARS após a injeção de AG no estriado de ratos *ex vivo* e *in vitro*;
6. Investigar o efeito da injeção intraestriatal de AG *ex vivo*, assim como, da adição de AG no meio de incubação *in vitro*, na atividade da Na⁺,K⁺-ATPase no estriado de ratos;
7. Investigar o efeito da administração de GM1 após a injeção intraestriatal de AG *ex vivo*, assim como, da adição de GM1 no meio de incubação, na presença ou ausência de AG *in vitro*, sobre a atividade da Na⁺,K⁺-ATPase no estriado de ratos;
8. Investigar se há correlação entre a produção de TBARS, carbonilação protéica e a atividade da Na⁺,K⁺-ATPase com as convulsões induzidas pelo AG no estriado de ratos;
9. Avaliar se a administração de muscimol, um agonista de receptor GABA_A, e antagonistas glutamatérgicos ionotrópicos, como o MK-801 e DNQX, protegem contra as convulsões e inibição da Na⁺,K⁺-ATPase no estriado de ratos;
10. Investigar se o GM1 protege das convulsões, aumento da produção de TBARS, carbonilação protéica e inibição da Na⁺,K⁺-ATPase induzida pela injeção de PTZ no estriado de ratos;
11. Determinar se há correlação entre a atividade da Na⁺,K⁺-ATPase com as convulsões induzidas pelo PTZ no estriado de ratos.

ARTIGO II

ARTICLE IN PRESS

YNBDL01205; No. of pages: 13; 4C



ELSEVIER

**Neurobiology
of Disease**

 www.elsevier.com/locate/ynbdi
 Neurobiology of Disease xx (2006) xxx – xxx

GM1 ganglioside prevents seizures, Na⁺,K⁺-ATPase activity inhibition and oxidative stress induced by glutaric acid and pentylentetrazole

 Michele Rechia Figuera,^a Luiz Fernando Freire Royes,^a Ana Flávia Furian,^a Mauro Schneider Oliveira,^a Natália Gindri Fiorenza,^a Roberto Frussa-Filho,^b João Carlos Petry,^a Rafael Correa Coelho,^a and Carlos Fernando Mello^{a,*}
^aLaboratório de Psicofarmacologia e Neurotoxicologia, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

^bDepartamento de Farmacologia, Universidade Federal de São Paulo, 04023-900 São Paulo, SP, Brazil

Received 23 July 2005; revised 23 December 2005; accepted 2 January 2006

Monosialoganglioside (GM1) is a glycosphingolipid that protects against some neurological conditions, such as seizures and ischemia. Glutaric acidemia type I (GA-I) is an inherited disease characterized by striatal degeneration, seizures, and accumulation of glutaric acid (GA). In this study, we show that GA inhibits Na⁺,K⁺-ATPase activity and increases oxidative damage markers (total protein carbonylation and thiobarbituric acid-reactive substances—TBARS) production in striatal homogenates from rats in vitro and ex vivo. It is also shown that GM1 (50 mg/kg, i.p., twice) protects against GA-induced (4 μmol/striatum) seizures, protein carbonylation, TBARS increase, and inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase activity ex vivo. Convulsive episodes induced by GA strongly correlated with Na⁺,K⁺-ATPase activity inhibition in the injected striatum but not with oxidative stress marker measures. Muscimol (46 pmol/striatum), but not MK-801 (3 nmol/striatum) and DNQX (8 nmol/striatum) prevented GA-induced convulsions, increase of TBARS and protein carbonylation and inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase activity. The protection of GM1 and muscimol against GA-induced seizures strongly correlated with Na⁺,K⁺-ATPase activity maintenance ex vivo. In addition, GM1 (50–200 μM) protected against Na⁺,K⁺-ATPase inhibition induced by GA (6 mM) but not against oxidative damage in vitro. GM1 also decreased pentylentetrazole (PTZ)-induced (1.8 μmol/striatum) seizures, Na⁺,K⁺-ATPase inhibition, and increase of TBARS and protein carbonyl in the striatum. These data suggest that Na⁺,K⁺-ATPase and GABA_A receptor-mediated mechanisms may play important roles in GA-induced seizures and in their prevention by GM1.

© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Seizure; EEG; Glutaric acid; Oxidative damage; GM1; Protein carbonylation; TBARS; Na⁺,K⁺-ATPase activity; PTZ

* Corresponding author. Fax: +55 55 3220 8241.

E-mail address: cf.mello@smail.ufsm.br (C.F. Mello).

 URL: <http://www.ufsm.br/neurotoxicidade> (C.F. Mello).

 Available online on ScienceDirect (www.sciencedirect.com).

Introduction

Gangliosides, particularly GM1 ganglioside, are known to modulate adaptive functions, such as neuronal plasticity (Perry et al., 2004), and memory formation (Silva et al., 2000). In addition, they have been proposed as neuroprotective agents against various excitotoxic agents or conditions, such as excitatory amino acid exposure and ischemia (Lombardi et al., 1989; Carolei et al., 1991). Accordingly, GM1 inhibits lipid peroxidation (Defeudis et al., 1979; Figuera et al., 2003) and may directly scavenge free radicals generated during reperfusion and protect receptors and enzymes from oxidative damage (Tyurin et al., 1991; Maulik et al., 1993). In addition, GM1 increases ascorbic acid levels in rat striatum and catalase activity in rat cerebral cortex (Figuera et al., 2003, 2004) and protects against ischemia-induced Na⁺,K⁺ and Mg²⁺ ATPase activity inhibition (Mahadik et al., 1989).

GM1 has also been proposed as an anticonvulsant, since it abolishes the recurrent epileptiform activity in rats induced by the intracerebral injection of antiserum to brain gangliosides (Karpiak et al., 1976, 1981) and attenuates methylmalonate-induced convulsions (Figuera et al., 2003). On the other hand, GM1 does not alter kindled-amygdaloid seizures (Albertson and Walby, 1987), and it is not known whether GM1 inhibits seizure induced by other chemical convulsants.

Glutaric acidemia type I (GA-I) is an inherited neurometabolic disorder caused by glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency, which leads to accumulation in body fluids and in brain of glutaric acid (GA), 3-hydroxyglutaric (3-OHGA), and, to a lesser extent, of glutaconic acids (Goodman and Kohlhoff, 1975). It is characterized by acute neurological compromise, including generalized convulsions, acute loss of motor skills, and dystonia (Freudenberg et al., 2004). If untreated, the disease is complicated by acute encephalopathic crises, resulting in neurodegeneration of vulnerable brain regions, particularly the putamen (Kölker et al., 2003).

ARTICLE IN PRESS

2

M.R. Figuera et al. / *Neurobiology of Disease* xx (2006) xxx–xxx

Brain imaging shows frontotemporal atrophy, acute striatal degeneration, and shrinkage of the caudate nuclei (Goodman and Frerman, 1995; Tortorelli et al., 2005). Although the mechanisms underlying brain damage in this disorder are not well established, growing evidence suggests that excitotoxicity (Lima et al., 1998; Kölker et al., 1999) and oxidative stress (Oliveira Marques et al., 2003) play a central role in the neuropathogenesis of this disease. In fact, GA causes convulsions in animals through GABAergic function impairment and glutamatergic mechanisms activation (Lima et al., 1998) and neuronal damage by NMDA receptors (NMDAR) activation (Kölker et al., 1999). Accordingly, in this study, we investigated whether GA increases total striatal TBARS and protein carbonylation (indicators of lipid and protein oxidative damage, respectively—see Brown and Kelly, 1996; Shacter et al., 1996) and causes Na^+, K^+ -ATPase activity inhibition *ex vivo* and if these neurochemical markers correlate with seizure activity.

Since pharmacological and neurochemical evidence support that GM1 decreases convulsions induced by glutamatergic activation (Figuera et al., 2003; Liu et al., 2004), increases antioxidant defenses in brain of rats (Figuera et al., 2003; 2004) and Na^+, K^+ -ATPase activity *in vitro* (Maulik et al., 1993), we decided to investigate whether (1) the systemic administration of GM1 protects against behavioral and electroencephalographic convulsions elicited by the intrastriatal injection of GA; (2) GM1 decreases GA-induced oxidative damage to proteins and lipids *ex vivo* and *in vitro*; (3) GM1 prevents GA-induced Na^+, K^+ -ATPase inhibition *ex vivo* and *in vitro*; (4) GA-induced convulsions and Na^+, K^+ -ATPase inhibition are sensitive to ionotropic glutamate antagonists and to a GABA_A agonist; (5) GM1 prevents the convulsions, oxidative damage, and Na^+, K^+ -ATPase inhibition induced by GABA_A receptor blockade.

Experimental procedures

Animal and reagents

Adult male Wistar rats (270–300 g) maintained under controlled light and environment (12:12-h light–dark cycle, 24 ± 1°C, 55% relative humidity) with free access to food (Guabi, Santa Maria, Brazil) and water were used. Animal utilization protocols followed the Official Government Ethics guidelines and were approved by the University Ethics Committee.

All reagents were purchased from Sigma (St. Louis, MO), except thiobarbituric acid (TBA), which was obtained from Merck (Darmstadt, Germany) and GM1 ganglioside, which was donated by TRB Pharma, the Brazilian representative of Fidia Research Laboratories.

Behavioral evaluation and surgical procedure

Animals were anesthetized with Equitesin (1% phenobarbital, 2% magnesium sulfate, 4% chloral hydrate, 42% propylene glycol, 11% ethanol; 3 ml/kg, *i.p.*) and placed in a rodent stereotaxic apparatus. Under stereotaxic guidance, a cannula was inserted unilaterally into the striatum (coordinates relative to bregma: AP 0 mm, ML 3.0 mm, V 3.0 mm from the dura) (Paxinos and Watson, 1986). Chloramphenicol (200 mg/kg, *i.p.*) was administered immediately before the surgical procedure.

The effect of the systemic administration of GM1 ganglioside on seizure activity, on striatal TBARS and protein carbonyl content

increase and striatal Na^+, K^+ -ATPase inhibition induced by GA was investigated by injecting the animals twice with GM1 ganglioside (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, buffered GA (4 μmol/2 μl) or NaCl (5.5 μmol/2 μl) was injected into the right striatum. This experimental protocol of GM1 administration has been shown to be effective in decreasing methylmalonate-induced convulsions and TBARS production in rat striatum (Figuera et al., 2003).

The effect of the intrastriatal administration of ionotropic glutamate antagonists and GABA_A agonist on seizure activity and striatal Na^+, K^+ -ATPase inhibition induced by GA was investigated by intrastriatally injecting the animals with DNQX (8 nmol/0.5 μl), MK-801 (3 nmol/0.5 μl), muscimol (46 pmol/0.5 μl), or saline (0.9% NaCl/0.5 μl), 30 min before GA administration. GA (3 μmol/1.5 μl, pH set to 7.4 with NaOH) or NaCl (4.1 μmol/1.5 μl) was injected into the right striatum.

The effectiveness of GM1 to prevent the convulsions and Na^+, K^+ -ATPase inhibition induced by GABA_A receptor blockade was assessed by giving the animals NaCl (0.9%, *i.p.*, twice) or GM1 ganglioside (50 mg/kg, *i.p.*, twice), as described above, 30 min before the injection of PTZ (1.8 μmol/2 μl) or NaCl (5.5 μmol/2 μl) into the right striatum (Oliveira et al., 2004).

Immediately after the intrastriatal injection, the animals were transferred to a round open field (54.7 cm in diameter). During 15 min, the animals were observed for the appearance of clonic movements of hindlimbs and forelimbs contralateral to the injected striatum. The number of clonic movement episodes and duration of such clonic movements were recorded with a stopwatch (de Mello et al., 1996).

Placement of cannula and electrodes for EEG recordings

Rats were surgically implanted with a cannula and electrodes under stereotaxic guidance. In brief, rats were deeply anesthetized with Equitesin (3 ml/kg, *i.p.*). Two screw electrodes were placed bilaterally over the parietal cortex, along with a ground lead positioned over the nasal sinus. Bipolar nichrome wire Teflon-insulated depth electrodes (100 μm) were implanted unilaterally into the striatum. For the intrastriatal infusion of drugs, a guide cannula (28 gauge) was glued to a multipin socket and inserted through a previously opened skull orifice. The coordinates from bregma for implantation of the electrodes were (in mm) AP, 0; L, 3; and DV, 3.5, which corresponds to the dorsal striatum (Paxinos and Watson, 1986). The electrodes were connected to a multipin socket and, together with the injection cannula, were fixed to the skull with dental acrylic cement. The experiments were performed 7–9 days after surgery when animals did not show any sign of pain, infection, or discomfort.

EEG recordings and intrastriatal injection of drugs

The procedures for EEG recording and intracerebral injection of drugs were carried out as previously described (Cavalheiro et al., 1992). Briefly, the animals were allowed to habituate to a Plexiglas cage (25 × 25 × 60 cm) for at least 10 min before the EEG recording. The rats were then connected to the lead socket in a swivel inside a Faraday's cage. Routinely, a 10-min baseline recording was obtained to establish an adequate control period. The protocol of drug injection used in this set of experiments was the same used in those experiments that evaluated the protective effect

ARTICLE IN PRESS

M.R. Figuera et al. / *Neurobiology of Disease* xx (2006) xxx–xxx

3

of GM1 on GA-induced behavioral convulsions, except that EEG was concomitantly recorded. EEG signals were amplified, filtered (0.1 to 50.0 Hz, bandpass), and recorded using an analogical encephalographer (Berger TP 119). Epochs were selected from preinfusion and postinfusion periods to determine significant EEG changes. The preinfusion segment was defined as ending immediately before the beginning of infusion of GA. EEG spikes amplitude was calculated as a percentage of the value before drug administration.

All intrastriatal injections were made by using a needle (30 gauge) protruding 1 mm below the guide cannula. All drugs were injected over 1-min period by using a Hamilton syringe, and an additional minute was allowed to elapse before removal of needle to avoid backflow of drug through the cannula.

TBARS assay ex vivo

Immediately after the behavioral evaluation, the animals were killed by decapitation and had their brain exposed by the removal of the parietal bone. A punch of the injected striatum was rapidly removed using a stainless steel puncher (5 mm in internal diameter) around the site of cannula placement. The contralateral hemisphere was subjected to the same procedure and served as internal control. Tissues were homogenized in 10 volumes (w/v) of 10 mM Tris–HCl (pH 7.4), containing sodium dodecyl sulfate (SDS 10%—final concentration) using a glass homogenizer and TBARS content was estimated in a medium containing 0.2 ml of brain homogenate, 0.1 ml of 8.1% SDS, 0.4 ml of acetic acid buffer (500 mM, pH 3.4), and 0.75 ml of 0.81% thiobarbituric acid (TBA). The mixture was finally made up to 2 ml with type I ultrapure water and heated at 95°C for 90 min in a water bath using a glass ball as a condenser. After cooling to room temperature, absorbance was measured in the supernatant at 532 nm (Ohkawa et al., 1979).

TBARS assay in vitro

Due to the previously reported antioxidant action of GM1 ganglioside (Maulik et al., 1993), we decided to test whether this compound could alter GA-induced TBARS generation in rat striatum homogenates *in vitro*. Striata from experimentally naive rats were homogenized in 10 volumes (w/v) of 10 mM Tris–HCl (pH 7.4), containing sodium dodecyl sulfate (SDS 10%—final concentration) using a glass homogenizer. An aliquot of 0.2 ml of homogenate was added to a medium containing GM1 ganglioside (50–200 μ M) and GA (6 mM). The mixture was incubated for 60 min at 37°C. TBARS content in the incubation medium was determined at the end of incubation, as described above.

Colorimetric determination of the protein carbonyl content ex vivo

Striatal tissue was homogenized in 10 volumes (w/v) of 10 mM Tris–HCl buffer (pH 7.4) using a glass homogenizer, and its carbonyl protein content was determined by the method described by Yan et al. (1995), adapted for brain tissue, as below. Briefly, homogenates were diluted to 750–800 μ g/ml of protein in each sample, and 1 ml aliquots were mixed with 0.2 ml of 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH, 10 mM) or 0.2 ml HCl (2 M). After incubation at room temperature for 1 h in a dark ambient, 0.6 ml of denaturing buffer (150 mM sodium phosphate buffer, pH 6.8, containing 3% SDS), 1.8 ml of heptane (99.5%), and 1.8 ml of

ethanol (99.8%) were added sequentially and mixed with vortex agitation for 40 s and centrifuged for 15 min. Next, the protein isolated from the interface was washed two times with 1 ml of ethyl acetate/ethanol 1:1 (v/v) and suspended in 1 ml of denaturing buffer. Each DNPH sample was read at 370 nm in a Hitachi U-2001 spectrophotometer against the corresponding HCl sample (blank) and total carbonylation calculated using a molar extinction coefficient of 22,000 $M^{-1} cm^{-1}$, as described by Levine et al. (1990).

Colorimetric determination of the protein carbonyl content in vitro

The striata from experimentally naive animals were homogenized, as described above. An aliquot of the homogenate (0.2 ml) was incubated in a medium containing GM1 ganglioside (50–200 μ M) in the absence or presence of GA (6 mM) for 60 min at 37°C. Protein carbonylation was determined at the end of incubation, as described above.

Na⁺,K⁺-ATPase activity measurements ex vivo

The measurement of Na⁺,K⁺-ATPase activity was standardized for the same fresh, diluted, non-centrifuged homogenates used for determination of the striatal protein carbonyl content. Assay of enzyme activity was performed following the method described by Wyse et al. (2000). Briefly, the incubation medium consisted of 30 mM Tris–HCl buffer, pH 7.4; 0.1 mM EDTA, 50 mM NaCl, 5 mM KCl, 6 mM MgCl₂, and 15 μ g of protein in the presence or absence of ouabain (1 mM), in a final volume of 250 μ l. The reaction was started by the addition of adenosine triphosphate (ATP) to a final concentration of 5 mM. After 30 min at 37°C, the reaction was stopped by the addition of 200 μ l of 5.7% ammonium molybdate in 6 N H₂SO₄. Saturating substrate concentrations were used, and the reaction was linear with protein and time. Appropriate controls were included in the assays for non-enzymatic hydrolysis of ATP. The amount of inorganic phosphate released was quantified by the colorimetric method described by Fiske and Subbarow (1925), and Na⁺,K⁺-ATPase activity was calculated by subtracting the ouabain-sensitive activity from the overall activity (in the absence of ouabain).

Na⁺,K⁺-ATPase activity measurements in vitro

The striata from experimentally naive animals were homogenized, as described above. An aliquot of the homogenate (0.2 ml) was incubated in a medium containing GM1 ganglioside (50–200 μ M) in the absence or presence of GA (6 mM) for 60 min at 37°C. Na⁺,K⁺-ATPase activity was determined at the end of incubation, as described above.

Protein determination

Protein content for biochemical experiments was measured colorimetrically by the method of Bradford (1976) by using bovine serum albumin (1 mg/ml) as standard.

Statistical analysis

Behavioral data were analyzed by a two-way ANOVA. Data from total protein carbonylation, TBARS production, and Na⁺,K⁺-ATPase activity determinations *ex vivo* were analyzed by a three-

ARTICLE IN PRESS

4

M.R. Figuera et al. / Neurobiology of Disease xx (2006) xxx–xxx

way ANOVA, with the hemisphere treated as a within-subject factor. Post hoc analyses were carried out by the *F* test for simple effect or the Student–Newman–Keuls test, when appropriate. All data are expressed as mean \pm SEM.

Data from protein carbonylation, TBARS production, and Na^+, K^+ -ATPase activity experiments in vitro were analyzed by a 2 (presence or absence of GM1) \times 2 (presence or absence of GA) factorial ANOVA. Post hoc analyses were carried out by the *F* test for simple effect or the Student–Newman–Keuls test, when appropriate. All data are expressed as mean \pm SEM. Correlation analyses were carried out using the Pearson's correlation coefficient. $P < 0.05$ was considered significant.

Results

Figs. 1A and B show the effect of GM1 ganglioside on the number and duration of convulsive episodes elicited by GA, respectively. Statistical analysis revealed that the administration of GM1 ganglioside reduced the number [significant pretreatment (NaCl or GM1) by treatment (NaCl or GA) interaction: $F(1,23) = 6.5$; $P < 0.05$] and duration [significant pretreatment (NaCl or GM1) by treatment (NaCl or GA) interaction: $F(1,23) = 7.54$; $P < 0.05$] of convulsive episodes. EEG recordings confirmed behavioral seizures elicited by the intrastriatal injection of GA and their prevention by the systemic administration of GM1 (Figs. 2A and B, respectively). The following behavioral repertoire occurred concomitantly with electrographically recorded seizures: clonus of the left forelimb and/or left hindlimb and head, accompanied by rotational behavior. Furthermore, electrographic recording of the ipsilateral striatum revealed that the striatal GA administration caused the appearance of an epileptogenic focus in the injected striatum that spread to the ipsi- and contralateral cerebral cortex after 4 min of GA infusion. Seizures were defined by the occurrence of episodes consisting of the simultaneous occurrence of at least two of the following alterations in all four recording leads: high-frequency and/or polyspike complexes and/or high-voltage synchronized spike activity. These episodes initiated 4–5 min after GA injection (Fig. 2A-III) and persisted (Fig. 2A-IV) up to the end of the observation period (15 min). GA induced the appearance of high-voltage synchronic clusters in the EEG

(Fig. 2A-III), and repetitive seizure episodes increased the incidence of synchronous spiking along time (Fig. 2A-IV). In all animals, electrographic recording of the injected striatum revealed increase of discharges at an amplitude of $80 \mu\text{V} \pm 0.02$ (before drugs administration) to $238.0 \pm 2.3 \mu\text{V}$ (mean \pm SEM) after striatal GA administration, which spread to the ipsi- and contralateral cerebral cortex after of GA infusion (data not shown). GM1 ganglioside prevented ictal activity induced by GA during all the observation period (Fig. 2B-VII/VIII). GM1 decreased GA-induced spike amplitude to between 60% and 70% with a mean of $81 \pm 1.2 \mu\text{V}$ ($n = 4$) when compared with GA-treated rats (data not shown).

In addition, the effect of the intrastriatal GA injection and systemic administration of GM1 on the TBARS and total protein carbonylation of the injected and non-injected striata was evaluated (Table 1). Statistical analysis revealed that GM1 administration reduced TBARS generation [significant pretreatment (NaCl or GM1) by treatment (NaCl or GA) by hemisphere (contralateral or injected) interaction: $F(1,22) = 10.09$; $P < 0.05$] and total protein carbonylation increase [significant pretreatment (NaCl or GM1) by treatment (NaCl or GA) by hemisphere (contralateral or injected) interaction: $F(1,22) = 6.31$; $P < 0.05$] induced by GA in the striatum of rats.

The effect of the intrastriatal injection of GA and of the systemic administration of GM1 on striatal Na^+, K^+ -ATPase activity ex vivo was also evaluated (Table 1). Statistical analysis revealed a significant pretreatment (NaCl or GM1) by treatment (NaCl or GA) by hemisphere (contralateral or injected) interaction: [$F(1,21) = 11.31$; $P < 0.005$]. Post hoc analysis showed that the intrastriatal GA administration decreased Na^+, K^+ -ATPase activity and that systemic GM1 administration prevented the GA-induced Na^+, K^+ -ATPase activity inhibition.

Correlation analyses (Pearson's correlation coefficient) of the duration of convulsive episodes with neurochemical measures (Na^+, K^+ -ATPase activity and oxidative damage markers) revealed that the duration of convulsive episodes induced by GA strongly correlated with Na^+, K^+ -ATPase activity inhibition ($r = 0.864$; $P < 0.05$ —Fig. 3A), but not with TBARS production or total protein carbonylation (Figs. 4A and B, respectively). Convulsive activity also strongly correlated with the Na^+, K^+ -ATPase activity inhibition in animals treated with GM1 and GA ($r = 0.802$; $P < 0.05$ —Fig. 3B). These results imply that convulsive activity and Na^+, K^+ -ATPase activity inhibition by GA are closely linked events.

Since acute systemic GM1 ganglioside administration protected against GA-induced protein carbonylation and TBARS increase ex vivo, we decided to evaluate a possible direct antioxidant role for GM1 in striatal homogenates in vitro. In order to choose the dose of GA to be used in the subsequent experiments, we performed a dose–effect curve, which is shown in Fig. 5. Statistical analysis (one-way ANOVA followed by the SNK test) revealed that incubation of striatal homogenates with GA (6 mM) increased TBARS production in vitro [$F(1,3) = 18.48$; $P < 0.001$]. Therefore, this dose of GA was used in the subsequent in vitro experiments.

GM1, however, did not alter GA-induced TBARS and total protein carbonylation increase in vitro (Table 2). Statistical analysis revealed that GA increased TBARS production [$F(1,41) = 18.48$; $P < 0.05$] and protein carbonylation [$F(1,59) = 10.72$; $P < 0.05$] in striatal homogenates and that GM1 (50 to 200 μM) did not alter GA-induced TBARS production [$F(3,41) = 0.28$; $P > 0.05$] and total protein carbonylation increase [$F(3,59) = 1.08$; $P > 0.05$].

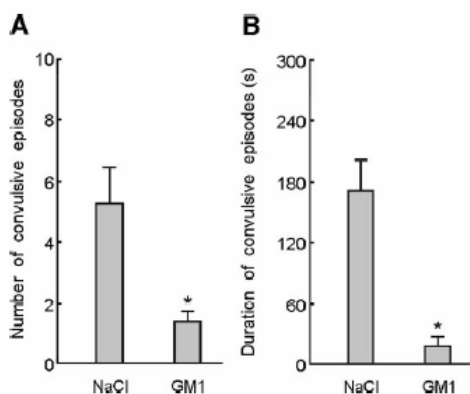


Fig. 1. Effect of GM1 ganglioside on the number (A) and duration (B) of convulsive episodes elicited by intrastriatal injection of GA (filled columns). Data mean \pm SEM for $n = 6–8$ in each group. * $P < 0.05$ compared with NaCl–GA group (Student–Newman–Keuls test).

ARTICLE IN PRESS

M.R. Figuera et al. / Neurobiology of Disease xx (2006) xxx–xxx

5

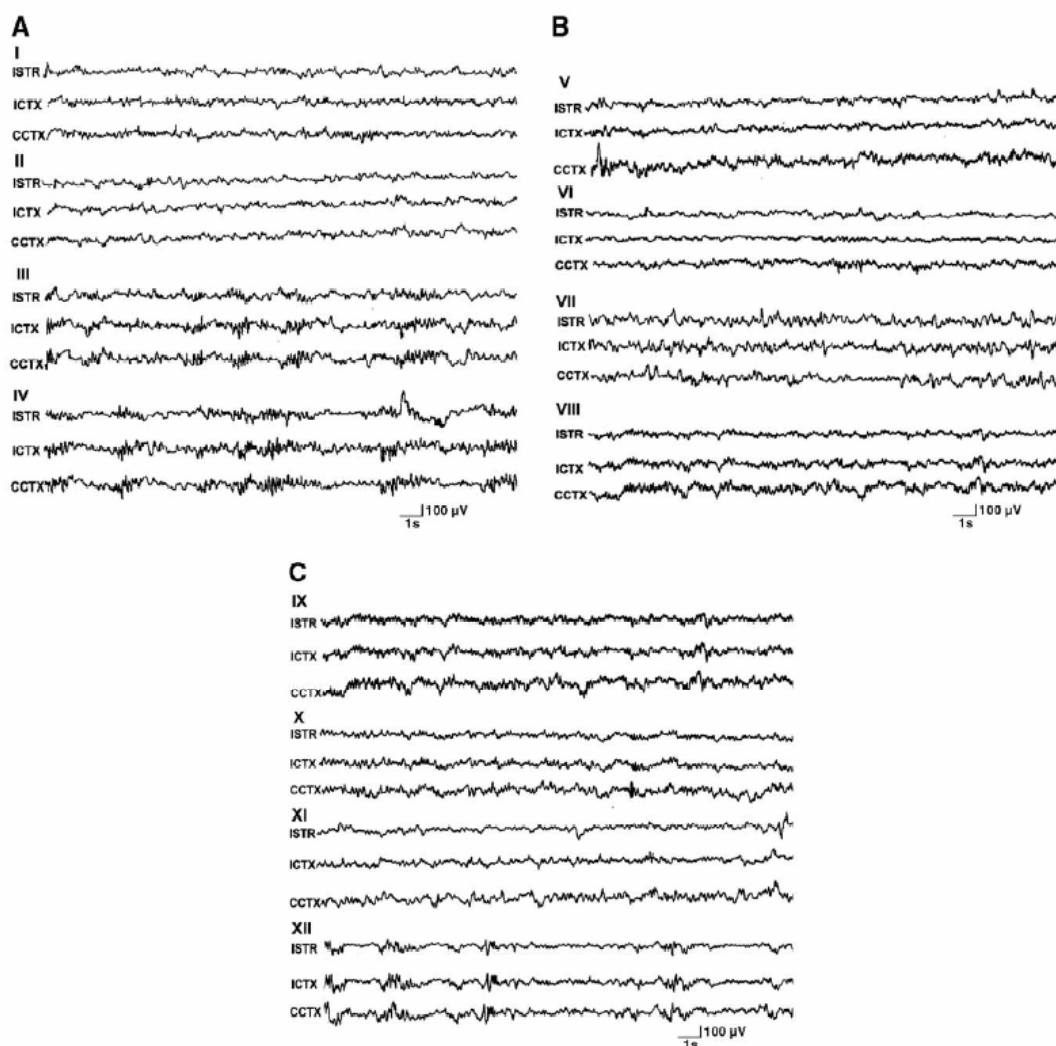


Fig. 2. (A) Typical electroencephalographic recordings registered before (I) and after (II) the injection of 0.9% NaCl (1 ml/kg, i.p.). Typical seizure sequences observed 5–10 min after the intraatrial infusion of GA (4 μmol/2 μl; III–IV). Arrows indicate the beginning (III) and the end of a convulsive episode (IV), which was accompanied by the behavioral alterations described in the Results section. (B) Typical electroencephalographic recordings registered before (V) and after (VI) the administration of GM1 (50 mg/kg, i.p., twice, 24 h and 30 min before intraatrial injection); and after the intraatrial injection of 4 μmol/2 μl of GA (VII–VIII). (C) Typical basal electroencephalographic recordings registered before (IX) and after (X) the intraatrial injection of muscimol (46 pmol/0.5 μl); and after the intraatrial injection of GA (3 μmol/1.5 μl; XI–XII). ISTR, ipsilateral striatum; ICTX, ipsilateral cortex; CCTX, contralateral cortex. Calibration bars, 100 μV and 1 s.

The effect of GA and of GM1 on the $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$ activity was also evaluated in vitro (Table 2). Statistical analysis revealed that GA decreased $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$ activity [$F(1, 51) = 4.36$; $P < 0.05$] in striatal homogenates, and that GM1 (50 to 200 μM) protected against GA-induced $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$ activity inhibition [$F(3,51) = 3.93$; $P < 0.05$].

In order to determine whether ionotropic glutamatergic and GABAergic mechanisms were involved in the $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$ inhibition by GA, animals were intraatrially injected with DNQX,

MK-801 or muscimol at doses that caused no apparent behavioral effects in the animals (Lima et al., 1998). MK-801 and DNQX, at the doses tested, did not alter GA-induced convulsions or inhibition of $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$ activity (data not shown).

Figs. 6A and B show the effect of muscimol on the number and duration of convulsive episodes elicited by GA, respectively. Statistical analysis revealed that the administration of muscimol (46 pmol) reduced the number [significant pretreatment (NaCl or muscimol) by treatment (NaCl or GA) interaction: $F(1,25) =$

ARTICLE IN PRESS

6

M.R. Figuera et al. / Neurobiology of Disease xx (2006) xxx–xxx

Table 1

Effect of GM1 ganglioside on TBARS content, total protein carbonylation increase and Na⁺,K⁺-ATPase activity inhibition elicited by the unilateral striatal injection of GA

Treatment	TBARS content (absorbance/mg protein)		Protein carbonyl content (nmol carbonyl/mg protein)		Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase activity (nmol Pi/mg protein/ min)	
	Contralateral striatum	Injected striatum	Contralateral striatum	Injected striatum	Contralateral striatum	Injected striatum
NaCl–NaCl	0.086 ± 0.01	0.120 ± 0.02	6.1 ± 0.7	6.1 ± 0.5	347.7 ± 23.0	391.2 ± 12.9
GM1–NaCl	0.097 ± 0.01	0.130 ± 0.02	6.7 ± 0.7	6.5 ± 0.4	347.8 ± 8.3	401.0 ± 24.0
NaCl–GA	0.162 ± 0.02	0.347 ± 0.03*	8.5 ± 0.6	11.9 ± 0.5*	338.8 ± 23.3	248.1 ± 10.0*
GM1–GA	0.102 ± 0.01	0.125 ± 0.01**	7.8 ± 1.1	6.2 ± 0.9**	358.4 ± 6.2	405.6 ± 8.7

Data mean ± SEM for *n* = 6–8 in each group.* *P* < 0.05 compared with NaCl–NaCl group (injected striatum) by the Student–Newman–Keuls test.** *P* < 0.05 compared with NaCl–GA group (injected striatum) by the Student–Newman–Keuls test.

43.02; *P* < 0.05] and duration [significant pretreatment (NaCl or muscimol) by treatment (NaCl or GA) interaction: *F*(1,25) = 5.96; *P* < 0.05] of convulsive episodes induced by GA. EEG recordings confirmed the prevention of GA-induced seizures by the intra-

striatal administration of muscimol (Fig. 2C). Muscimol decreased GA-induced spike amplitude to 60% with a mean of 92 ± 4.4 μV (*n* = 4) when compared with GA-treated rats (data not shown). These results are in agreement with the view that impaired GABAergic function plays a role in GA-induced convulsions (Lima et al., 1998). Muscimol also prevented GA-induced increase of TBARS [significant pretreatment (NaCl or muscimol) by treatment (NaCl or GA) by hemisphere (contralateral or injected) interaction: *F*(1,24) = 6.04; *P* < 0.05—Table 3] and protein carbonylation [significant pretreatment (NaCl or muscimol) by treatment (NaCl or GA) by hemisphere (contralateral or injected) interaction: *F*(1,24) = 10.20; *P* < 0.005—Table 3], inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase activity [significant pretreatment (NaCl or muscimol) by treatment (NaCl or GA) by hemisphere (contralateral or injected) interaction: *F*(1,26) = 4.79; *P* < 0.05—Table 3] and a highly significant negative correlation between Na⁺,K⁺-ATPase activity in the injected striatum and time spent convulsing was evidenced in this set of experiments (Pearson's correlation coefficient = −0.882; *P* < 0.05—Fig. 7A), even in the presence of muscimol (Pearson's correlation coefficient = −0.790; *P* < 0.05—Fig. 7B).

The protective effect of GM1 against the convulsions, oxidative damage, and Na⁺,K⁺-ATPase inhibition induced by an acute GABA_A receptor blockade was also evaluated. Statistical analysis revealed that GM1 prevented PTZ-induced convulsions [significant pretreatment (NaCl or GM1) by treatment (NaCl or PTZ) interaction for number *F*(1,27) = 6.94; *P* < 0.05—Fig. 8A and duration *F*(1,27) = 19.6; *P* < 0.001; of convulsive episodes—Fig. 8B]. EEG recordings confirmed that PTZ-induced seizures (Fig. 9A) were prevented by systemic administration of GM1 (Fig. 9B). GM1 also prevented PTZ-induced increase of TBARS [significant pretreatment (NaCl or GM1) by treatment (NaCl or PTZ) by hemisphere (control or injected) interaction: *F*(1,26) = 4.74; *P* < 0.05—Table 4] and protein carbonylation [significant pretreatment (NaCl or GM1) by treatment (NaCl or PTZ) by hemisphere (contralateral or injected) interaction: *F*(1,26) = 7.76; *P* < 0.01—Table 4], inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase activity [significant pretreatment (NaCl or GM1) by treatment (NaCl or PTZ) by hemisphere (control or injected) interaction: *F*(1,27) = 9.29; *P* < 0.01—Table 4]. Furthermore, a highly significant negative correlation (Pearson's correlation coefficient) between Na⁺,K⁺-ATPase activity in the injected striatum and time spent convulsing was evidenced in this set of experiments (*r* = −0.832; *P* < 0.01—Fig. 10A). Since GM1 almost abolished PTZ-induced convulsions, only a tendency towards a negative correlation between Na⁺,K⁺-ATPase activity and time spent convulsing was observed in the group of animals injected

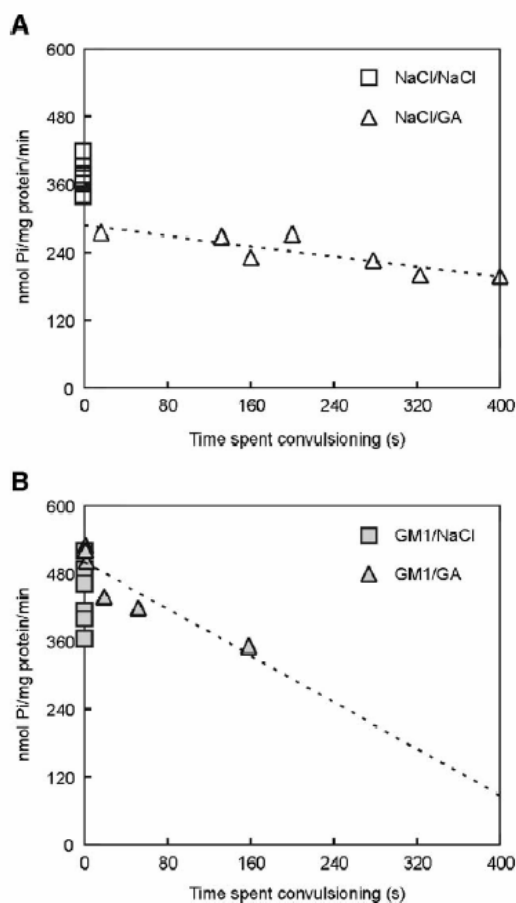


Fig. 3. Duration of convulsive episodes induced by GA correlates with inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase activity in the injected striatum (Pearson's correlation coefficient). (A) Animals treated with GA. (B) Animals treated with GM1 and GA. Data are individual values for *n* = 7 in each group.

ARTICLE IN PRESS

M.R. Figuera et al. / *Neurobiology of Disease* xx (2006) xxx–xxx

7

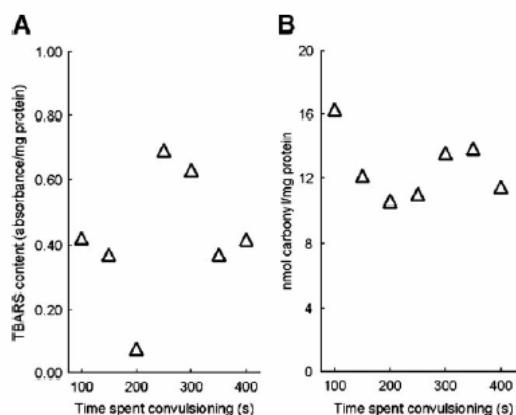


Fig. 4. Duration of seizures induced by GA does not correlate with total lipoperoxidation (A) or with total carbonyl content (B) of the injected striatum (Pearson's correlation coefficient). Data are individual values for $n = 7$ in each group.

with PTZ and GM1 (Pearson's correlation coefficient = -0.589 ; $P < 0.1$ —Fig. 10B).

Discussion

In the current study, we showed that GM1 prevents GA-induced behavioral and electroencephalographic convulsions and oxidative damage *ex vivo*, as well as Na^+/K^+ -ATPase activity inhibition *ex vivo* and *in vitro*. However, GM1 did not protect against GA-induced TBARS production and protein carbonylation *in vitro*. In addition, GM1 also protected against PTZ-induced convulsions, oxidative damage, and Na^+/K^+ -ATPase activity inhibition.

Reactive species can be highly damaging to cells due to the oxidation of essential cellular constituents such as lipids, proteins, and DNA, which can be measured by identification of their byproducts, such as malondialdehyde (Reiter, 1995) and protein carbonyl (Levine et al., 1990; Oliveira et al., 2004). Furthermore, it has been reported that reactive species are involved in neuronal death and Na^+/K^+ -ATPase activity inhibition (Huang et al., 1992). The central nervous system (CNS) is highly sensitive to oxidative stress due to its high iron and polyunsaturated fatty acids content and the low activity of antioxidant defenses (Reiter, 1995). In the CNS, mitochondrial dysfunction and consequent ATP depletion are a major cause of oxidative stress and calcium homeostasis alterations (Cassarino and Bennett, 1999), which produces loss of cellular integrity and cell death. Indeed, various CNS disorders have been associated with mitochondrial dysfunction, excitotoxicity, and reactive species generation (Cassarino and Bennett, 1999; Figuera et al., 2003), such as seizures, Parkinson, Huntington, and Alzheimer diseases (Cassarino and Bennett, 1999; Ramassamy et al., 2000; Figuera et al., 2003; Poon et al., 2005). In line with this view, it has been suggested that some inborn errors of the metabolism may have a similar mechanism of acute neurotoxicity, due to the accumulation of metabolic inhibitors and/or defective activity of enzymes involved in energy metabolism. This seems to be the case of GA, the main metabolite that accumulates in GA-I, which also inhibits glutamate decarboxylase activity (Stokke et al.,

1976) and causes convulsions through glutamatergic and GABAergic mechanisms (Lima et al., 1998) and reactive species generation *in vitro* (Oliveira Marques et al., 2003).

The currently reported GA-induced increase of striatal TBARS production and protein carbonylation *ex vivo* is in agreement with the hypothesis that GA increases reactive species production and reduces antioxidant defenses, initially described as an *in vitro* phenomenon (Kölker et al., 2002; Oliveira Marques et al., 2003). Within this context, the demonstration that GM1 prevents both striatal oxidative stress and convulsions induced by intrastriatal injections of GA are in line with the inhibitory effect of this glycosphingolipid on reserpine-induced orofacial dyskinesia (Vital et al., 1997), which has been proposed as a motor consequence of striatal oxidative stress (Abilio et al., 2004; Faria et al., 2005).

Various studies have demonstrated that substances that modulate GABAergic function and/or inhibit glutamatergic transmission may decrease convulsive episodes and reactive species generation (Defeudis et al., 1979; Karpiak et al., 1981; Amato et al., 1999; Figuera et al., 2003; Royes et al., 2003). Accordingly, it has been suggested that gangliosides physiologically modulate the GABAergic function, since the intracerebral injection of antiserum to brain gangliosides inhibits [^3H]GABA binding (Defeudis et al., 1979) and produces recurrent epileptiform activity in rats, which is abolished by GM1 administration (Karpiak et al., 1981). In fact, it has been reported that GM1 administration reduces the excitotoxic damage to GABAergic striatal neurons and prevents GAD activity inhibition induced by intrastriatal injection of quinolinic acid (Lombardi et al., 1989). GM1 also prevents cell death (Liu et al., 2004) and neurotoxicity elicited by NMDA activation (Hoffman et al., 1995). Although it has been reported that GM1 does not have a direct effect on the NMDA receptor (Lombardi et al., 1989), GM1-induced NMDA receptor inactivation could result from indirect mechanisms, such as ascorbate increase (Figuera et al., 2003). Therefore, considering that (1) GABAergic and NMDA receptor mechanisms and GAD activity inhibition are thought to play a role in GA-induced

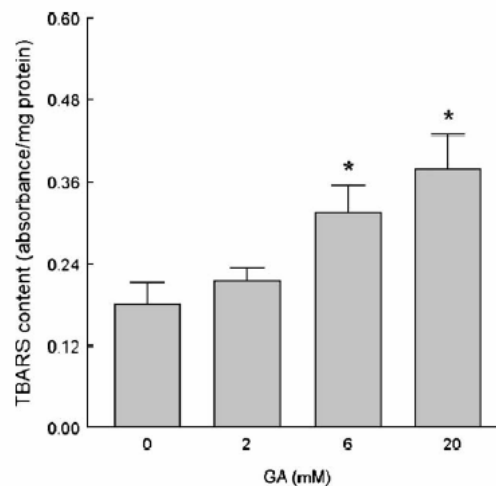


Fig. 5. Incubation of striatal homogenates with GA (0–20 mM) *in vitro* increases TBARS production. Data are mean \pm SEM for $n = 6–8$ in each group. * $P < 0.05$ compared with the control group (GA 0 mM) (Student–Newman–Keuls test).

ARTICLE IN PRESS

8

M.R. Figuera et al. / Neurobiology of Disease xx (2006) xxx–xxx

Table 2
Effect of GM1 ganglioside on TBARS content, total protein carbonylation increase and Na⁺,K⁺-ATPase activity inhibition elicited by GA (6 mM) in vitro

Treatment	TBARS content (absorbance/mg protein)		Protein carbonyl content (nmol carbonyl/mg protein)		Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase activity (nmol Pi/mg protein/ min)	
	Vehicle	GA	Vehicle	GA	Vehicle	GA
Vehicle	0.19 ± 0.030	0.316 ± 0.04*	11.7 ± 1.2	24.0 ± 1.2*	368 ± 12.87	207.6 ± 34.8*
GM1 (50 μM)	0.15 ± 0.023	0.248 ± 0.025*	11.5 ± 1.8	21.0 ± 1.6*	343.6 ± 12.8	366.4 ± 47.8**
GM1 (100 μM)	0.15 ± 0.013	0.279 ± 0.015*	11.0 ± 0.8	20.0 ± 1.3*	395.5 ± 27.6	405.0 ± 30.6**
GM1 (200 μM)	0.14 ± 0.012	0.307 ± 0.037*	13.8 ± 0.8	19.0 ± 1.8*	361.6 ± 38.0	412.5 ± 35.5**

Data mean ± SEM for *n* = 6–8 in each group.

* *P* < 0.05 compared with vehicle–vehicle group by the Student–Newman–Keuls test.

** *P* < 0.05 compared with vehicle–GA group by the Student–Newman–Keuls test.

neurotoxicity (Lombardi et al., 1989; Lima et al., 1998; Kölker et al., 1999, 2002); (2) GM1 ganglioside modulates GABAergic function and prevents neurotoxicity induced by glutamatergic activation; it is reasonable to expect this glycolipid to attenuate GA-induced deleterious effects, particularly those in which glutamatergic activation and GABAergic function impairment have been implied, such as convulsions and oxidative damage. In this context, GM1 met these expectations, since it prevented GA-induced behavioral and electrographic convulsions and oxidative damage. Conversely, while GM1 ganglioside protected against GA-induced end products of reactive species generation *ex vivo*, it did not protect against GA-induced striatal TBARS content and total protein carbonylation increase *in vitro*. These findings agree with the view that the antioxidant action of GM1 *in vitro* is not due to an intrinsic antioxidant activity of this glycolipid but due to a secondary decrease of reactive species generation and/or increase of antioxidant defenses (Figuera et al., 2003, 2004). These data fully agree with the work of Tyurin et al. (1992), who have described that the inhibitory effect of GM1 on TBARS accumulation in synaptosomes is abolished by previous thermal denaturation or if liposomes made of lipids isolated from brain synaptosomes were used, indicating that cellular intactness is required to observe the antioxidant effects of GM1. The same authors also suggested that GM1 might interact with signal transduction systems because the antioxidant effect of GM1 was also prevented by previous incubation with polymyxin B, an inhibitor of lipid-dependent protein kinases. In line with this view,

we have recently shown that the administration of GM1 increases catalase activity in brain homogenates *ex vivo*, but not if GM1 is added directly to brain homogenates (Figuera et al., 2004), indicating that some degree of cellular intactness is required to GM1 increase catalase activity and, consequently, antioxidant defenses.

It is also worth remarking that, in individual basis, we found no correlation between oxidative damage marker increase and convulsive activity, making difficult to postulate a cause–effect relationship between protein and lipid oxidative damage and the development of convulsions by GA. Notwithstanding, one might also consider the possibility that selected targets, which could not contribute significantly to the total oxidative damage, could be responsible for the convulsant action of GA, such as Na⁺,K⁺-ATPase (Kölker et al., 2002).

Although any cellular constituent may be a target for free radical damage, some selected target failure may increase cellular excitability and facilitate the appearance of convulsions (Patel, 2004). Na⁺,K⁺-ATPase is one of these targets because it is responsible for maintaining ion gradients across plasma membranes, and its inhibition causes seizures in mice (Jamme et al., 1995). Moreover, it has been reported that Na⁺,K⁺-ATPase activity is diminished in the postmortem epileptic human brain (Grisar et al., 1992) and in experimental models of focal epilepsy, such as the intracerebral proline (Pontes et al., 2001), methylmalonic acid (Malfatti et al., 2003), and PTZ injections (Oliveira et al., 2004). Therefore, Na⁺,K⁺-ATPase may be a possible target for GA to cause the appearance of convulsive activity. The most striking finding in this study was the demonstration of a strong correlation between Na⁺,K⁺-ATPase activity inhibition and the duration of convulsions (Fig. 3A). Importantly, treatment with GM1 prevented GA-induced convulsions and Na⁺,K⁺-ATPase activity inhibition, maintaining the correlation between total duration of convulsions and Na⁺,K⁺-ATPase activity inhibition (i.e., those animals treated with GM1, presented less convulsions and had an improved Na⁺,K⁺-ATPase activity—Fig. 3B).

In what concerns the inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase activity by GA, while it may directly inhibit Na⁺,K⁺-ATPase activity, it is also possible that indirect mechanisms may account for it, such as the production of reactive species, which cause enzyme damage. Accordingly, GA decreases Na⁺,K⁺-ATPase activity in neuronal cultures, and such an inhibition is prevented by glutathione (Kölker et al., 2002). These findings suggest that GA may modulate Na⁺,K⁺-ATPase activity in neurons by redox mechanisms. In fact, it has long been known that the Na⁺,K⁺-ATPase activity is particularly sensitive to reactive species, which alter plasma membrane lipid composition (Jamme et al., 1995) and the redox

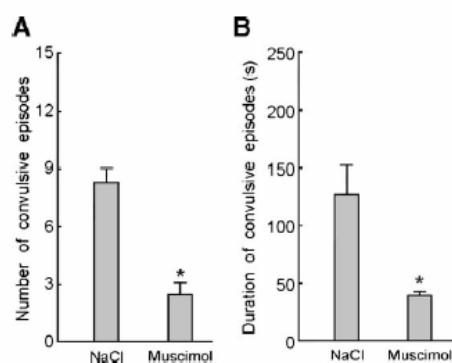


Fig. 6. Effect of muscimol (46 pmol) on the number (A) and duration of convulsive episodes (B) elicited by intrastriatal injection of GA (3 μmol/1.5 μl—filled columns). Data mean ± SEM for *n* = 7–8 in each group. **P* < 0.05 compared with NaCl–GA group (Student–Newman–Keuls test).

ARTICLE IN PRESS

M.R. Figuera et al. / Neurobiology of Disease xx (2006) xxx–xxx

9

Table 3

Effect of muscimol on TBARS content, total protein carbonylation increase and Na⁺,K⁺-ATPase activity inhibition elicited by the unilateral striatal injection of GA

Treatment	TBARS content (absorbance/mg protein)		Protein carbonyl content (nmol carbonyl/mg protein)		Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase activity (nmol Pi/mg protein/min)	
	Contralateral striatum	Injected striatum	Contralateral striatum	Injected striatum	Contralateral striatum	Injected striatum
NaCl–NaCl	0.130 ± 0.03	0.181 ± 0.03	6.5 ± 0.5	6.1 ± 0.4	424.8 ± 42.5	389.2 ± 34.3
Musc–NaCl	0.170 ± 0.02	0.171 ± 0.02	6.8 ± 0.5	7.2 ± 0.3	399.8 ± 35.4	362.2 ± 40.7
NaCl–GA	0.281 ± 0.05	0.538 ± 0.06*	9.2 ± 0.5	13.0 ± 0.6*	345.0 ± 34.3	226.4 ± 26.5*
Musc–GA	0.230 ± 0.05	0.257 ± 0.04**	7.8 ± 0.8	8.1 ± 0.7**	427.0 ± 41.5	432.4 ± 46.0**

Data mean ± SEM for n = 6–8 in each group. Musc: Muscimol (46 pmol).

* P < 0.05 compared with NaCl–NaCl group (injected striatum) by the Student–Newman–Keuls test.

** P < 0.05 compared with NaCl–GA group (injected striatum) by the Student–Newman–Keuls test.

state of regulatory sulfhydryl groups as well as other amino acid residues (Morel et al., 1998). Therefore, considering the sensitivity of Na⁺,K⁺-ATPase to reactive species-induced damage and/or inhibition by GA, it is plausible that this enzyme activity may be impaired by intrastriatal GA injection and may contribute to GA-

related hyperexcitability. Although our data support that the currently reported protection against GA-induced Na⁺,K⁺-ATPase activity inhibition by GMI is not due to the antioxidant activity this glycolipid, specific studies evaluating the introduction of carbonyl groups into side-chains of the enzyme and modulation of redox regulatory sites have to be performed in order to clarify this point. This is particularly important considering the fact that in the current study, Na⁺,K⁺-ATPase inhibition did not correlate with total protein carbonylation or lipid oxidation measures.

Considering that GM1 and MK-801 prevent glutamate-induced inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase activity in rat brain synaptosomes (Avrova et al., 2002), we decided to investigate whether ionotropic glutamate receptors were involved in the currently described inactivation of Na⁺,K⁺-ATPase activity by GA. The ionotropic glutamate receptor antagonists MK-801 and DNQX had no effect on GA-induced convulsions and inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase activity ex vivo, suggesting that these receptors are not involved in these deleterious effects of GA. These results confirm the previously reported lack of effect of ionotropic glutamate antagonists against GA-induced convulsions (Lima et al., 1998) and extend it to a neurochemical effect of GA.

Since it has been previously reported that minute amounts of muscimol antagonize GA-induced convulsions (Lima et al., 1998), we decided to investigate if this GABA_A agonist could also prevent the GA-induced inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase activity ex vivo. Muscimol significantly reduced convulsions

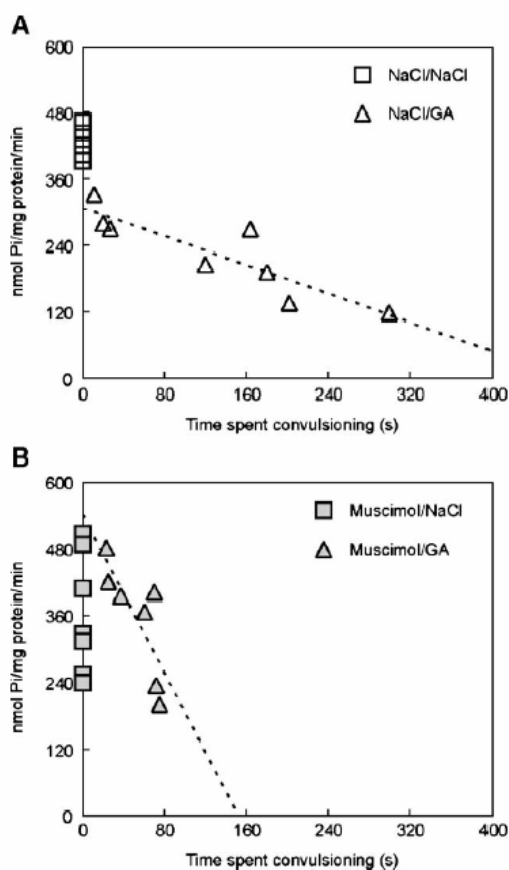


Fig. 7. Duration of convulsive episodes induced by GA correlates with inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase activity in the injected striatum (Pearson's correlation coefficient). (A) Animals treated with GA. (B) Animals treated with muscimol and GA. Data are individual values for n = 7–8 in each group.

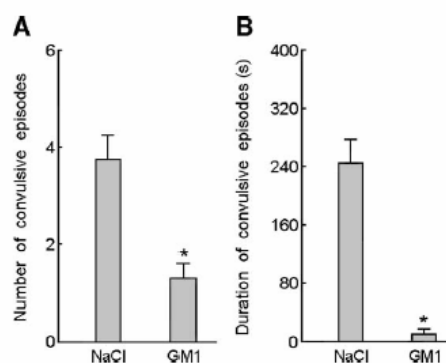


Fig. 8. Effect of GM1 ganglioside on the number (A) and duration (B) of convulsive episodes elicited by intrastriatal injection of PTZ (filled columns). Data mean ± SEM for n = 7–8 in each group. *P < 0.05 compared with NaCl–PTZ group (Student–Newman–Keuls test).

ARTICLE IN PRESS

10

M.R. Figuera et al. / Neurobiology of Disease xx (2006) xxx–xxx

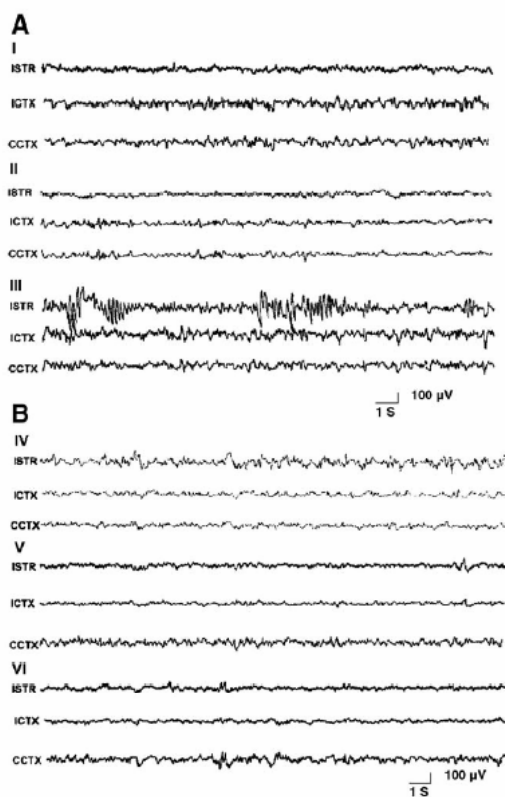


Fig. 9. (A) Typical electroencephalographic recordings registered before (I) and after (II) the injection of 0.9% NaCl (1 ml/kg, i.p.). Typical seizure sequences observed 5–10 min after the intrastratial injection of PTZ (1.8 μmol/2 μl; III). (B) Typical electroencephalographic recordings registered before (IV) and after (V) the injection of GM1 (50 mg/kg, i.p., twice, 24 h and 30 min before intrastratial injection); and after the intrastratial injection of 1.8 μmol of PTZ (VI). ISTR, ipsilateral striatum; ICTX, ipsilateral cortex; CCTX, contralateral cortex. Calibration bars, 100 μV and 1 s.

(Figs. 6A and B) and $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$ inhibition induced by GA (Table 3). Interestingly, $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$ inhibition in the injected striatum significantly correlated with convulsive activity, regard-

Table 4

Effect of GM1 ganglioside on TBARS content, total protein carbonylation increase and $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$ activity inhibition elicited by the unilateral striatal injection of PTZ

Treatment	TBARS content (absorbance/mg protein)		Protein carbonyl content (nmol carbonyl/mg protein)		$\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$ activity (nmol Pi/mg protein/ min)	
	Contralateral striatum	Injected striatum	Contralateral striatum	Injected striatum	Contralateral striatum	Injected striatum
NaCl–NaCl	0.150 ± 0.01	0.146 ± 0.01	6.0 ± 0.3	6.1 ± 0.6	349.0 ± 19.3	371.1 ± 10.6
GM1–NaCl	0.101 ± 0.01	0.130 ± 0.02	6.2 ± 0.9	7.9 ± 0.8	363.0 ± 20.0	374.0 ± 28.0
NaCl–PTZ	0.197 ± 0.02	0.251 ± 0.02*	8.3 ± 1.0	11.9 ± 0.9*	347.0 ± 35.0	154.0 ± 22.3*
GM1–PTZ	0.137 ± 0.02	0.130 ± 0.01**	7.5 ± 0.9	6.8 ± 0.5**	358.0 ± 19.0	362.0 ± 18.6**

Data mean ± SEM for $n = 6–8$ in each group.

* $P < 0.05$ compared with NaCl–NaCl group (injected striatum) by the Student–Newman–Keuls test.

** $P < 0.05$ compared with NaCl–PTZ group (injected striatum) by the Student–Newman–Keuls test.

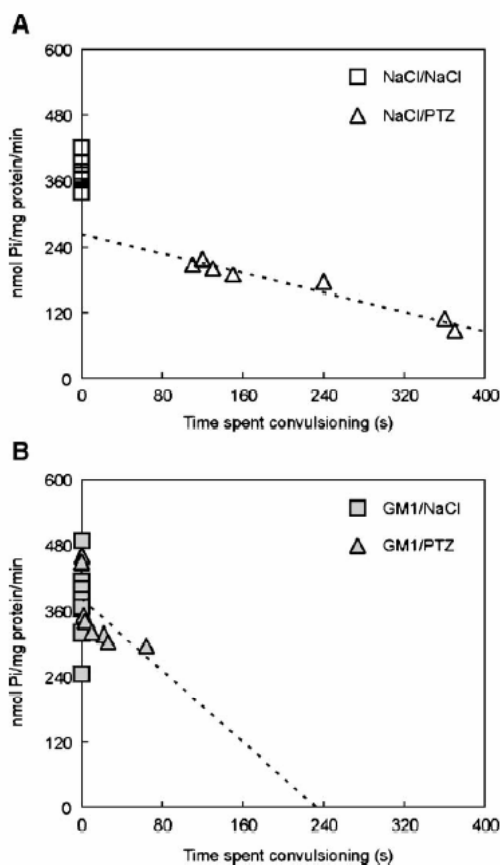


Fig. 10. Duration of convulsive episodes induced by PTZ correlates with inhibition of $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$ activity in the injected striatum (Pearson's correlation coefficient). (A) Animals treated with PTZ. (B) Animals treated with GM1 and PTZ. Data are individual values for $n = 7$ in each group.

less of the presence of muscimol (Figs. 7A and B). These results were remarkably similar to the results observed with GM1 ganglioside (Fig. 3B), indicating that muscimol and GM1 may have similar mechanisms of action or act in a convergent mechanism, which results in protection from $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$ inhibition by convulsive activity. Therefore, it became important

ARTICLE IN PRESS

M.R. Figuera et al. / *Neurobiology of Disease* xx (2006) xxx–xxx

11

to test whether GM1 reversed the effects of a GABA_A antagonist, PTZ, in order to assess if GM1 could prevent the effects of an acute blockade of the GABAergic transmission. If GM1 protected against PTZ-induced convulsions and Na⁺,K⁺-ATPase inhibition (Oliveira et al., 2004), the GABAergic system could be pointed as a possible target for GM1. As can be seen in Fig. 9 and Table 4, GM1 prevented both convulsions and Na⁺,K⁺-ATPase inhibition induced by PTZ, showing that this glycolipid may antagonize the effects of an acute GABAergic blockade and making the GABAergic system a putative target for GM1. However, one must be aware that these experiments do not rule out a role for GM1 in a convergent pathway leading to convulsions and Na⁺,K⁺-ATPase inhibition, particularly because other compounds, such as antioxidants, prevent convulsions and Na⁺,K⁺-ATPase inhibition induced by GABA_A blockade (Oliveira et al., 2004) and by partial metabolic impairment (Royes et al., 2003), probably by acting at sites downstream glutamate and GABA_A receptors. Therefore, the importance of Na⁺,K⁺-ATPase activity for the genesis of the convulsions induced by GA is not established, and future studies evaluating the appearance of events along time will define whether a cause–effect relationship between these events exists. Our results also indicate that a GABAergic failure may underlie the currently observed inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase activity by GA, and that GM1 may act on the GABAergic system, since it also prevented the convulsions and inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase activity induced by PTZ. However, it is worth pointing out that the systemic administration of GM1 caused neither sedation nor increased locomotion in the open field (data not shown), which are common effects of the administration of drugs that alter GABAergic transmission. Therefore, further studies are necessary to define the GABAergic system as a target for GM1.

Mechanisms other than reactive species scavenging and GABAergic facilitation have been claimed to account for the neuroprotective actions of GM1, such as increase of plasma membrane fluidity (Mahadik et al., 1989), facilitation of the action of neurotrophic factors, modulation of neuronal development and differentiation (Hakomori, 1981), inhibition of PKC and its translocation to membrane (Pei et al., 2002), inhibition of phospholipase A₂ (Petroni et al., 1989), and direct stimulation of Na⁺,K⁺-ATPase activity (Leon et al., 1981). Therefore, we cannot rule out that the neuroprotective effects of GM1 on the convulsions and Na⁺,K⁺-ATPase activity *ex vivo* and *in vitro* are mediated, at least in part, by one of these mechanisms (Nishi et al., 1999; Malfatti et al., 2003; Oliveira et al., 2004) or by a direct effect this glycolipid on Na⁺,K⁺-ATPase (Nishi et al., 1999). Specific studies are necessary to determine the involvement of these alternative mechanisms in the currently described protective effect of GM1 against GA-induced convulsions and Na⁺,K⁺-ATPase activity inhibition and other questions, such as if the protective effect of GM1 is restricted to the striatum and if GA may significantly affect other brain areas.

One last point to be considered regards to the concentrations of GA and GM1 used in the present study. The concentrations of GA capable of causing oxidative damage *in vitro* are within the range known to accumulate in the plasma during metabolic crises of the disease (Goodman and Frerman, 1995). On the other hand, concentrations used in the *ex vivo* studies can not be compared to those observed in the brain of patients because we cannot assess the extent of GA diffusion, as well as its rates of metabolism and removal by blood. However, the concentration of the injected

solutions is high, within the molar range. Striatal injection protocols usually require concentrations of neurotoxins within this range to cause significant effects compared to studies *in vitro*, in which similar effects are demonstrated using the same compounds, but in concentrations within the millimolar range (Kölker et al., 2000; McLaughlin et al., 1998; Narasimham et al., 1996; de Mello et al., 1996; Davolio and Greenamyre, 1995; Zeevalk et al., 2000). A possible explanation for such a difference may be a more effective diffusion, compartmentalization, and metabolism of these compounds *in vivo* due to blood perfusion, which could rapidly decrease their concentration in the injected tissue. Although the neurochemical effects induced by GA *in vitro* and *ex vivo* were remarkably similar: inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase and increase of oxidation markers, it is possible that some of the effects here reported might have been due to a high local concentration of GA in the *ex vivo* experiments.

In summary, the current study reports for the first time a positive correlation between GA-induced Na⁺,K⁺-ATPase inhibition and convulsive activity and that GM1 prevents GA-induced seizures and inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase activity *ex vivo* and *in vitro*. In addition, GM1 attenuates oxidative damage *ex vivo*, but not *in vitro*. Our results also suggest that the neuroprotective effects of GM1 against GA-induced behavioral, electrographic, and neurochemical parameters may involve GABAergic mechanisms, considering that GM1 prevented also the acute behavioral and neurochemical effects of GABA_A receptor blockade. Therefore, if the effects detected in this study also occur in patients with GA-I, it is tempting to propose that they may contribute, at least in part, to the neurological dysfunction found in GA-I, and that the administration of GM1 should be considered as an adjuvant therapy for these patients. However, further in-depth studies are necessary to establish a definitive mechanism for GA-induced oxidative damage, Na⁺,K⁺-ATPase inhibition and convulsive activity, and if a cause–effect relationship exists between these events.

Acknowledgments

Work supported by CNPq (grants: 500120/2003-0 and 505527/2004-9), FAPERGS, CAPES, and FIPE/UFMS. C.F. Mello, L.F.F. Royes, M. Schneider Oliveira, A. F. Furian, R. Frussa-Filho, and N.G. Fiorenza are the recipients of CNPq fellowships. The authors gratefully acknowledge Dr. Esper A. Cavalheiro, from the Federal University of São Paulo, Brazil, for the generous donation of the electroencephalographer used in this study and TRB Pharma, the Brazilian representative of Fidia Laboratories for kindly donating GM1 ganglioside.

References

- Abílio, V.C., Silva, R.H., Carvalho, R.C., Grassl, C., Calzavara, M.B., Registro, S., D'Almeida, V., Ribeiro, R.A., Frussa-Filho, R., 2004. Important role of striatal catalase in aging- and reserpine-induced oral dyskinesia. *Neuropharmacology* 47, 263–272.
- Albertson, T.E., Walby, W.F., 1987. The effect of exogenous GM1 ganglioside on kindled-amygdaloid seizures. *Neuropharmacology* 26, 261–264.
- Amato, A., Connolly, C.N., Moss, S.J., Smart, T.G., 1999. Modulation of neuronal and recombinant GABA_A receptors by redox reagents. *J. Physiol.* 517, 35–50.
- Avrova, N.F., Zakharova, I.O., Tyurin, V.A., Tyurina, Y.Y., Gamaley, I.A.,

ARTICLE IN PRESS

12

M.R. Figuera et al. / *Neurobiology of Disease* xx (2006) xxx–xxx

- Schepetkin, I.A., 2002. Different metabolic effects of ganglioside GM1 in brain synaptosomes and phagocytic cells. *Neurochem. Res.* 27, 751–759.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Brown, R.K., Kelly, F.J., 1996. Peroxides and other products. In: Panchard, N.A., Kelly, F.J. (Eds.), *Free Radicals, A Practical Approach*. Oxford Univ. Press, New York, pp. 119–131.
- Carolei, A., Fieschi, C., Bruno, R., Toffano, G., 1991. Monosialoganglioside GM1 in cerebral ischemia. *Cerebrovasc. Brain Metab. Rev.* 3, 134–157.
- Cassarino, D.S., Bennett, J.P., 1999. An evaluation of the role of mitochondrial in neurodegenerative diseases: mitochondrial mutations and oxidative pathology, protective nuclear responses, and cell death in neurodegeneration. *Brain Res. Rev.* 29, 1–25.
- Cavalheiro, E.A., de Fero, M.R., Mecarelli, O., Ricci, G., 1992. Age-related anticonvulsant activity of NMDA in the rat caudate-putamen. *Brain Res.* 67, 371–374.
- Davolio, C., Greenamyre, J.T., 1995. Selective vulnerability of the CA1 region of hippocampus to the indirect excitotoxic effects of malonic acid. *Neurosci. Lett.* 192, 29–32.
- de Mello, C.F., Begnini, J., Jiménez-Bernal, R.E., Rubin, M.A., de Bastiani, J., da Costa, E.Jr.M., Wajner, M., 1996. Intrastratial methylmalonic acid administration induces rotational behavior and convulsions through glutamatergic mechanisms. *Brain Res.* 721, 120–125.
- Defeudis, F.V., Yusuf, A.N.K., Ossola, L., Maitre, M., Wolff, P., Rebel, G., Mandel, P., 1979. Antiserum to gangliosides inhibits [³H] GABA binding to a synaptosome-enriched fraction of rat cerebral cortex. *Gen. Pharmacol.* 2, 251–254.
- Faria, R.R., Abílio, V.C., Grassl, C., Chinen, C.C., Negrão, L.T., de Castro, J.P., Fukushiro, D.F., Rodrigues, M.S., Gomes, P.H., Registro, S., de Carvalho, R.C., D'Almeida, V., Silva, R.H., Ribeiro, R.A., Frussa-Filho, R., 2005. Beneficial effects of vitamin C and vitamin E on reserpine-induced oral dyskinesia in rats: critical role of striatal catalase activity. *Neuropharmacology* 48, 993–1001.
- Figuera, M.R., Bonini, J.S., 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 reactive substances production induced by the intrastratial injection of methylmalonic acid. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 35, 465–473.
- 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 Res.* 38, 495–500.
- Fiske, C.H., Subbarow, Y., 1925. The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* 66, 375–400.
- Freundenberg, F., Lukacs, Z., Ullrich, K., 2004. 3-Hydroxyglutaric acid fails to affect the viability of primary neuronal rat cells. *Neurobiol. Dis.* 16, 581–584.
- Goodman, S.I., Fremman, F.E., 1995. Organic acidemias due to defects in lysine oxidation: 2-ketoadipic acidemia and glutaric acidemia. In: Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D. (Eds.), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. McGraw-Hill, New York, pp. 1451–1460.
- Goodman, S.I., Kohlhoff, J.G., 1975. Glutaric aciduria: inherited deficiency of glutaryl-CoA dehydrogenase activity. *Biochem. Med.* 13, 138–140.
- Grisar, T., Guillaume, D., Delgado-Escueta, A.V., 1992. Contribution of Na⁺K⁺-ATPase to focal epilepsy: a brief review. *Epilepsy Res.* 12, 141–149.
- Hakomori, S.I., 1981. Glycosphingolipids in cellular interaction, differentiation, and oncogenesis. *Annu. Rev. Biochem.* 50, 733–764.
- Hoffman, P.L., Iorio, K.R., Snell, L.D., Tabakoff, B., 1995. Attenuation of glutamate-induced neurotoxicity in chronically ethanol-exposed cerebellar granule cells by NMDA receptor antagonists and ganglioside GM1. *Alcohol: Clin. Exp. Res.* 19, 721–726.
- Huang, W.H., Wang, Y., Askari, A., 1992. Na⁺K⁺-ATPase: inactivation and degradation induced by oxygen radicals. *Int. J. Biochem.* 24, 621–626.
- Jamme, I., Petit, E., Divoux, D., 1995. Modulation of mouse cerebral Na⁺K⁺-ATPase activity by oxygen free radicals. *NeuroReport* 7, 333–337.
- Karpiak, S.E., Graf, L., Rapport, M.M., 1976. Antiserum to brain gangliosides produces recurrent epileptiform activity. *Science* 194, 735–737.
- 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.
- Kölker, S., Ahlemeyer, B., Kriegelstein, J., Hoffmann, G.F., 1999. 3-Hydroxyglutaric and glutaric acids are neurotoxic through NMDA receptors in vitro. *J. Inherited Metab. Dis.* 22, 259–262.
- Kölker, S., Ahlemeyer, B., Kriegelstein, J., Hoffmann, G.F., 2000. Methylmalonic acid induces excitotoxic neuronal damage in vitro. *J. Inherited Metab. Dis.* 23, 355–358.
- Kölker, S., Okun, J.G., Ahlemeyer, B., Wyse, A.T.S., Horster, F., Wajner, M., Kohlmüller, D., Mayatepek, E., Kriegelstein, J., Hoffmann, G.F., 2002. Chronic treatment with glutaric acid induces partial tolerance to excitotoxicity in neuronal cultures from chick embryo telencephalons. *J. Neurosci. Res.* 68, 424–431.
- Kölker, S., Hoffmann, G.F., Schor, D.S., Feyh, P., Wagner, L., Jeffrey, I., Pourfarzam, M., Okun, J.G., Zschocke, J., Baric, I., Bain, M.D., Jakobs, C., Chalmers, R.A., 2003. Glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency: region-specific analysis of organic acids and acylcamitines in post mortem brain predicts vulnerability of the putamen. *Neuropediatrics* 34, 253–260.
- Leon, A., Facci, L., Toffano, G., Sonnino, S., Tettamanti, G., 1981. Activation of Na⁺K⁺-ATPase by nanomolar concentrations of GM1 ganglioside. *J. Neurochem.* 37, 350–357.
- Livine, R.L., Garland, D., Oliver, C.N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A.G.I., Ahn, B.W., Shaltiel, S., Stadman, E.R., 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 186, 464–478.
- Lima, T.T.F., Begnini, J., de Bastiani, J., Ribeiro, M.C., de Mello, C.F., 1998. Pharmacological evidence for GABAergic and glutamatergic involvement in the convulsant and behavioral effects of glutaric acid. *Brain Res.* 802, 55–60.
- Liu, J.R., Ding, M.P., Wei, E.Q., Huang, J.Z., Song, Y., Ding, Q., Ge, Q.F., 2004. Monosialoganglioside protected ischemic rat hippocampal slices through stabilizing expression of N-methyl-D-aspartate receptor subunit. *Acta Pharmacol. Sin.* 25, 727–732.
- Lombardi, G., Zannoni, R., Moroni, F., 1989. Systemic injection of GM1 ganglioside reduces quinolinic acid-induced striatal lesions in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* 174, 123–125.
- 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⁺K⁺-ATPase and Mg²⁺-ATPase. *J. Neurosci. Res.* 24, 402–412.
- Malfatti, C.R., Royes, L.F.F., Francescato, L., Sanabria, E.R., Rubin, M.A., Cavalheiro, E.A., Mello, C.F., 2003. Intrastratial methylmalonic acid administration induces convulsions and TBARS production, and alters Na⁺K⁺-ATPase activity in the rat striatum and cerebral cortex. *Epilepsia* 44, 761–767.
- Maulik, N., Das, D.K., Gogineni, M., 1993. Reduction of myocardial ischemic reperfusion injury by sialylated glycosphingolipids, ganglioside. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 22, 74–81.
- McLaughlin, B.A., Nelson, D., Silver, I.A., Erecinska, M., Chesselet, M.F., 1998. Methylmalonate toxicity in primary neuronal cultures. *Neuroscience* 86, 279–290.
- Morel, P., Tallineau, C., Pontcharraud, R., Piriou, A., Huguet, F., 1998. Effects of 4-hydroxynonenal, a lipid peroxidation product, on dopamine transport and Na⁺K⁺ ATPase in rat striatal synaptosomes. *Neurochem. Int.* 33, 531–540.
- Narasimhan, P., Sklar, R., Murrell, M., Swanson, R.A., Sharp, R., 1996. Methylmalonyl-CoA mutase induction by cerebral ischemia and

ARTICLE IN PRESS

M.R. Figuera et al. / Neurobiology of Disease xx (2006) xxx–xxx

13

- neurotoxicity of the mitochondrial toxin methylmalonic acid. *J. Neurosci.* 16, 7336–7346.
- Nishi, A., Fisone, G., Snyder, G.L., Dulubova, I., Aperia, A., Naim, A.C., Greengard, P., 1999. Regulation of Na⁺, K⁺-ATPase isoforms in rat neostriatum by dopamine and protein kinase C. *J. Neurochem.* 731, 492–501.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95, 351–358.
- Oliveira, M.S., Furian, A.F., Royes, L.F.F., Figuera, M.R., Myskiw, J.C., Fiorenza, N.G., Mello, C.F., 2004. Ascorbate modulates pentyleneetetrazol-induced convulsions biphasically. *Neuroscience* 128, 721–728.
- Oliveira Marques, F., Hagen, M.E.K., Pederzoli, K.D., Sgaravati, A.M., Durigon, K., Testa, C.G., Wannmacher, C.M.D., Wyse, A.T.S., Wajner, M., Dutra-Filho, C.S., 2003. Glutaric acid induces oxidative stress in vitro. *Brain Res.* 964, 153–158.
- Patel, M., 2004. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress: cause and consequence of epileptic seizures. *Free Radical Biol. Med.* 15, 1951–1962.
- Paxinos, G., Watson, C., 1986. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 2nd ed. Academic Press, San Diego.
- Pei, B., Liu, Z.P., Chen, J.W., 2002. Ganglioside GM1 biphasically regulates the activity of protein kinase C by the effects on the structure of the lipid bilayer. *Chem. Phys. Lipids* 114, 131–138.
- Perry, J.C., Vital, M.A., Frussa-Filho, R., Tufik, S., Palermo-Neto, J., 2004. Monosialoganglioside (GM1) attenuates the behavioural effects of long-term haloperidol administration in supersensitive rats. *Eur. Neuro-psychopharmacol.* 14, 127–133.
- Petroni, A., Bertazzo, A., Sarti, S., Galli, C., 1989. Accumulation of arachidonic acid cyclo- and lipoxygenase products in rat brain during ischemia and reperfusion: effect of treatment with GM1-lactone. *J. Neurochem.* 53, 747–752.
- Pontes, Z.L., Oliveira, L.S., Franzon, R., Wajner, M., Wannmacher, C.M.D., Wyse, A.T.S., 2001. Inhibition of Na⁺, K⁺-ATPase from rat hippocampus by proline. *Neurochem. Res.* 26, 1321–1326.
- Poon, H.F., Fraser, M., Shreve, N., Calabrese, V., Wolozin, B., Butterfield, D.A., 2005. Mitochondrial associated metabolic proteins are selectively oxidized in A30P A-synuclein transgenic mice—a model of familial Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.* 18, 492–498.
- Ramassamy, C., Averill, D., Beffert, U., Theroux, L., Lussier-Cacan, S., Cohn, J.S., Christen, Y., Schoofs, A., Davignon, J., Poirier, J., 2000. Oxidative insults are associated with apolipoprotein E genotype in Alzheimer's disease brain. *Neurobiol. Dis.* 7, 23–37.
- Reiter, R.J., 1995. Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. *FASEB J.* 9, 526–553.
- Royes, L.F., Figuera, M.R., Furian, A.F., Oliveira, M.S., da Silva, L.G., Malfatti, C.R., Schneider, P.H., Braga, A.L., Wajner, M., Mello, C.F., 2003. Creatine protects against the convulsive behavior and lactate production elicited by the intrastriatal injection of methylmalonate. *Neuroscience* 118, 1079–1090.
- Shacter, E., Williams, J.A., Stadtman, E.R., Levine, R.L., 1996. Determination of carbonyl groups in oxidized proteins. In: PUNCHARD, N.A., KELLY, F.J. (Eds.), *Free Radicals, A Practical Approach*. Oxford Univ. Press, New York, pp. 159–170.
- Silva, R.H., Bergamo, M., Frussa-Filho, R., 2000. Effects of neonatal ganglioside GM1 administration on memory in adult and old rats. *Pharmacol. Toxicol.* 87, 120–125.
- Stokke, O., Goodman, S.I., Moe, P.G., 1976. Inhibition of brain glutamate decarboxylase by glutarate, glutaconate and β-hydroxyglutarate: explanation of symptoms in glutaric acidurias? *Clin. Chim. Acta* 66, 411–515.
- Tortorelli, S., Hahn, S.H., Cowan, T.M., Brewster, T.G., Rinaldo, P., Matem, D., 2005. The urinary excretion of glutarylcarnitine is an informative tool in the biochemical diagnosis of glutaric acidemia type I. *Mol. Genet. Metab.* 84, 137–143.
- Tyurin, V.A., Kuznetsova, L.A., Tyurina, Y.Y., Erin, A.N., Avrova, N.F., Kagan, V.E., 1991. Role of gangliosides in protection of beta-adrenoceptors against damage by lipid peroxidation in synaptosomal membranes. *Bull. Exp. Biol. Med. (USSR)* 111, 779–783.
- Tyurin, V.A., Tyurina, Y.Y., Avrova, N.F., 1992. Ganglioside-dependent factor inhibiting lipid peroxidation in rat brain synaptosomes. *Neurochem. Int.* 20, 401–407.
- Vital, M.A.B.F., Frussa-Filho, R., Palermo-Neto, J., 1997. Effects of monosialoganglioside on a new animal model of tardive dyskinesia. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* 21, 1169–1179.
- Wyse, A.T., Streck, E.L., Barros, S.V., Brusque, A.M., Zugno, A.I., Wajner, M., 2000. Methylmalonate administration decreases Na⁺, K⁺-ATPase activity in cerebral cortex of rats. *NeuroReport* 11, 2331–2334.
- Yan, L.J., Traber, M.G., Packer, L., 1995. Spectrophotometric method for determination of carbonyls in oxidatively modified apolipoprotein B of human low-density lipoproteins. *Anal. Biochem.* 228, 349–351.
- Zeevalk, G.D., Bernard, L.P., Nicklas, W.J., 2000. Oxidative stress during energy impairment in mesencephalic cultures is not a downstream consequence of a secondary excitotoxicity. *Neuroscience* 96, 309–316.

DISCUSSÃO GERAL

V- DISCUSSÃO GERAL

O SNC é particularmente sensível à ação das espécies reativas (ERs) devido a sua dependência do metabolismo aeróbico, altos níveis de ácidos graxos poli-insaturados e baixa atividade das defesas antioxidantes (Wajner et al., 2004). A disfunção mitocondrial e consequente depleção de ATP são uma das maiores causas de estresse oxidativo e de alteração na homeostase do cálcio no SNC, causando perda da integridade celular (Cassarino e Bennet, 1999).

A integridade e sobrevivência do organismo dependem da regulação da homeostase celular. A homeostase celular pode ser alterada por vários agentes, incluindo as EAO e EAN (Cassarino & Bennet, 1999), e a célula regula a formação dessas ERs por meio de suas defesas antioxidantes, que incluem as enzimas antioxidantes CAT, SOD e GSH-Px. Vários fatores podem regular a atividade dessas enzimas como a deficiência de cobre (Ames, 2000), o próprio estresse oxidativo (Cassarino & Bennet, 1999), assim como o NGF (Sampath et al., 1995). No SNC, o NGF estimula a resistência celular ao estresse oxidativo, protege as células dos efeitos tóxicos das ERs e aumenta os níveis de RNAm da CAT e GSH-Px nas células PC12 de maneira tempo e dose-dependentes (Sampath et al., 1995). Além do NGF, os gangliosídeos, também exercem efeitos neuritogênicos e neurotróficos (Hadjiconstantinon e Neff, 1998).

A utilização de gangliosídeos exógenos, especialmente o monossialogangliosídeo, tem sido proposta para uma grande diversidade de injúrias incluindo eletrolíticas, neurotóxicas, cirúrgicas e lesões isquêmicas, bem como em modelos animais de doenças neurodegenerativas (Carolei et al., 1991; Tajirine et al., 1997). Estudos têm demonstrado que, quando administrados em cultura de neurônios *in vitro*, os gangliosídeos promovem efeitos neurotróficos e neuritogênicos (Ledeen, 1984). Acredita-se que as propriedades neuritogênicas e neurotróficas possam estar relacionadas à potencialização da ação do NGF promovida por essa substância.

Diversos estudos *in vitro* confirmaram o efeito sinérgico entre gangliosídeos e NGF (Kato-Semba et al., 1984; Leon et al., 1984), sendo que a ação potencializadora dos gangliosídeos sobre o NGF também foi demonstrada *in vivo*. Foi verificado que o GM1 potencializa a ação do NGF em neurônios colinérgicos centrais em ratos (Di Patre et al., 1989; Casamenti et al., 1989), e esse tratamento combinado também foi capaz de promover

melhora em parâmetros bioquímicos, morfológicos e comportamentais em ratos adultos após lesão cortical (Garofalo & Cuelo, 1990).

O mecanismo pelo qual os gangliosídeos potencializam as ações do NGF ainda é controverso. Enquanto há evidências de que esses glicosfingolipídeos exerceriam seus efeitos após a internalização do NGF pela célula (Gonatas et al., 1983), tem sido relatado na literatura que o GM1 associa-se diretamente com o receptor de membrana para NGF e regula sua função, ou ainda, que o GM1 promoveria a fosforilação das proteínas de transdução de sinal responsivas ao NGF (Mutoh et al., 1995; Rabin & Mocchetti, 1995).

A administração de gangliosídeos parece ser efetiva na recuperação após lesões do SNC. Nesse sentido, Mahadik & Karpiak (1986) relataram que a administração intraperitoneal de GM1 em ratos promove uma redução tanto na assimetria comportamental quanto na perda da atividade da Na^+, K^+ -ATPase que se seguem à lesão da via nigroestriatal por 6-OH-dopamina. Outros estudos também demonstraram um efeito facilitador dos gangliosídeos na recuperação de lesões no SNC, não só no sistema nigroestriatal (Toffano et al., 1983), mas também na região do septo hipocampal (Wojcik et al., 1982) e no córtex entorrinal (Karpiak, 1983). Os gangliosídeos também protegem os neurônios após hipoglicemia, mantendo os níveis de lactato por mais tempo (Zoli et al., 1990), e previne a morte neuronal induzida por apoptose (Ferrari et al., 1995).

Tendo em vista a ação neuroprotetora apresentada pelo GM1 para uma grande diversidade de patologias relacionadas ao sistema nervoso e a vulnerabilidade do cérebro à ação das ERs, no presente trabalho investigou-se o efeito do gangliosídeo GM1 sobre os parâmetros de estresse oxidativo como a quimiluminescência (uma medida de lipoperoxidação), capacidade antioxidante total (TRAP - medida das defesas antioxidantes teciduais) e atividade das enzimas antioxidantes (CAT, SOD e GSH-Px).

A atividade da enzima catalase (CAT), que catalisa a dismutação do H_2O_2 para formar O_2 e H_2O , se encontra fundamentalmente nos peroxissomos, onde remove o H_2O_2 , gerado pela β -oxidação dos ácidos graxos ou na oxidação dos alcanos. Sua atividade catalítica é o principal processo que regula os níveis intracelulares de H_2O_2 (Gaetani, 1989). A CAT é induzida por aumento da produção de H_2O_2 (Koechlin, 1952; Witting & Horwitt, 1964), e também por componentes do SNC como o NGF (Jackson et al., 1994; Sampath et al., 1994; Nistico et al., 1992). A diminuição da atividade desta enzima no cérebro pode contribuir para a vulnerabilidade neuronal (Moreno et al., 1995). Nós verificamos que a administração do gangliosídeo GM1 aumentou a atividade da CAT *ex vivo* (Tabela I – Artigo I), sem alterar a

atividade da SOD e GSH-Px (Tabela II – Artigo 1). O aumento da CAT pode estar relacionado à potencialização da ação do NGF pelo GM1, uma vez que foi descrito que o gangliosídeo GM1 potencializa a ação do NGF, e que este inibe a produção de RL (Nistico et al., 1992; Jackson et al., 1994; Sampath et al., 1994). O NGF parece estimular a atividade da CAT e da GSH-Px em células PC12 (Jackson et al., 1994; Sampath et al., 1994), e da SOD e CAT em cérebro de ratos idosos (Nistico et al., 1992). Sampath e colaboradores (1994) mostraram que o NGF aumenta a transcrição e a tradução da catalase. Portanto, é possível que a ação neuroprotetora do GM1 esteja relacionada à potencialização do efeito neurotrófico do NGF e que este fator de crescimento possa estimular a atividade da catalase no SNC.

Interessantemente, o efeito antioxidante do GM1 não foi demonstrado *in vitro*, sugerindo que este gangliosídeo necessita de um sistema organizado, dependente de uma estrutura intacta para exercer sua ação neuroprotetora. Isso é confirmado pelos nossos resultados que mostram que, embora o GM1 tenha reduzido a quimiluminescência e aumentado a atividade da CAT *ex vivo* (Tabela I – Artigo 1), ele não altera a quimiluminescência e inibe a atividade da catalase nas maiores concentrações *in vitro* (10^3 – 10^4 nM; Figura 1 – Artigo 1). De fato, nós mostramos que o efeito protetor do GM1 contra o aumento da produção de TBARS induzida pelo MMA depende de um sistema celular intacto (Figuera et al., 2003).

Tem sido descrito que, apesar da baixa atividade desta enzima no SNC, inibidores da catalase aumentam a toxicidade do oxigênio no SNC de ratos (Huckman, 1993; Zhang & Piantadosi, 1991). Além disso, a catalase, sozinha ou em combinação com a SOD, protege áreas cerebrais específicas como córtex, estriado, hipocampo e tálamo da injúria neuronal induzida por isquemia (Liu et al., 1989; Matsuyama et al., 1994). De fato, os neurônios altamente imunorreativos para a CAT apresentam uma resistência aumentada à isquemia comparados àqueles que expressam menos esta enzima (Moreno et al., 1995). Além disso, uma inibição da atividade da CAT, sem alteração na atividade da SOD cerebral, está associada a episódios de demência e ao aumento da neurotoxicidade do peptídeo β -amilóide na doença de Alzheimer (Gsell et al., 1995; Milton et al., 2001). Contudo, o papel da atividade da CAT como um determinante da susceptibilidade do SNC à ação das ERs, ainda é considerado controverso.

As espécies reativas podem ser nocivas para as células, devido à oxidação de constituintes essenciais como lipídeos, proteínas e DNA, que podem ser medidos por

identificação de seus produtos formados durante as reações, como o MDA (Reiter, 1995) e proteína carbonil (Levine et al., 1990; Oliveira et al., 2004). No SNC, a disfunção mitocondrial, e conseqüente depleção de ATP, é uma das maiores causas do dano oxidativo e alteração na homeostase do cálcio (Cassarino e Bennett, 1999), que causam perda da integridade da membrana plasmática, inibição da Na^+, K^+ -ATPase e morte celular (Huang et al., 1992). De fato, várias doenças do SNC estão associadas à disfunção mitocondrial, excitotoxicidade e geração de espécies reativas, como a epilepsia e as doenças de Parkinson, Huntington e Alzheimer (Cassarino e Bennett, 1999; Ramassamy et al., 2000; Fighera et al., 2003; Poon et al., 2005). Tem sido descrito que os radicais livres estão envolvidos na gênese das convulsões, desde que a administração intracortical de ferro induz descargas epileptiformes e concomitante aumento de radicais livres no cérebro e, ambos os fenômenos são inibidos por antioxidantes (Packer et al., 1996). Nesse contexto, tem sido sugerido que alguns erros inatos do metabolismo podem ter um mecanismo similar de neurotoxicidade aguda devido ao acúmulo de inibidores metabólicos e/ou defeitos na atividade de enzimas envolvidas no metabolismo energético. Este parece ser o caso do AG, um metabólito que acumula na AG-I, que causa convulsões por mecanismos GABAérgicos e glutamatérgicos (Lima et al., 1998) e geração de ERs *in vitro* (Oliveira Marques et al., 2003).

Tendo em vista que o GM1 possui propriedades antioxidantes e anticonvulsivantes, também foi objetivo deste estudo avaliar o efeito neuroprotetor da administração do gangliosídeo GM1 sobre os episódios convulsivos, dano oxidativo e a atividade da Na^+, K^+ -ATPase induzidos pelo AG no estriado de ratos.

Nossos resultados mostram que o AG induz o aparecimento de convulsões, que são acompanhadas de aumento da produção de TBARS e da carbonilação protéica. Estes dados estão de acordo com a hipótese de que o AG aumenta a produção de ERs e reduz as defesas antioxidantes *in vitro* (Kolker et al., 2002; Oliveira Marques et al., 2003). Além disso, o efeito neuroprotetor do GM1 contra o dano oxidativo e as convulsões induzidas por AG estão de acordo com o efeito inibitório deste glicoesfingolípídeo na discinesia orofacial provocada pela reserpina (Vital et al., 1997), que tem sido proposta como uma conseqüência motora do estresse oxidativo estriatal (Abílio et al., 2004; Faria et al., 2005).

Vários estudos têm mostrado que substâncias que modulam a função GABAérgica e/ou inibem a transmissão glutamatérgica podem diminuir os episódios convulsivos e a geração de radicais livres (Defeudis et al., 1979; Karpiak et al., 1981; Amato et al., 1999; Fighera et al., 2003; Royes et al., 2003). De fato, tem sido sugerido que os gangliosídeos

modulam a função GABAérgica, desde que a injeção intracerebral de anti-soro contra gangliosídeo cerebral inibe a ligação do GABA ao receptor (Defeudis et al., 1979) e causa atividade epileptiforme recorrente em ratos, que é abolida pela administração de GM1 (Karpiak et al., 1981). Além disso, a administração de GM1 reduz o dano excitotóxico aos neurônios GABAérgicos estriatais e previne a inibição da atividade da GAD induzida por ácido quinolínico no estriado de ratos (Lombardi et al., 1989). A administração de GM1 também previne a morte celular (Liu et al., 2004) e a neurotoxicidade induzida pela ativação de receptores NMDA (Hoffmann et al., 1995). Evidências sugerem que o GM1 não tem efeito direto nos receptores NMDA (Lombardi et al., 1989). Portanto, a inativação desses receptores pelo gangliosídeo pode ser devido a mecanismos secundários, como o aumento do ascorbato cerebral (Fighera et al., 2003). Além disso, considerando que: I) os mecanismos GABAérgicos e glutamatérgicos, e a inibição da atividade da GAD têm um papel importante na neurotoxicidade induzida pelo AG (Lombardi et al., 1989; Lima et al., 1998; Kölker et al., 1999; 2002); II) o GM1 modula a função GABAérgica e previne a neurotoxicidade induzida por ativação glutamatérgica; é possível propor que este glicosídeo atenua os efeitos tóxicos do AG, particularmente aqueles que envolvam a ativação glutamatérgica e a inibição da função GABAérgica, como as convulsões e o dano oxidativo. De fato, o GM1 preveniu as convulsões (comportamentais e eletrográficas – Figuras 1 e 2B respectivamente; Artigo 2) e o aumento da carbonilação protéica e lipoperoxidação induzidas por AG *ex vivo* (Tabela 1 - Artigo 2).

Interessantemente, enquanto o GM1 protegeu contra a geração de ERs *ex vivo*, ele não protegeu contra a produção de TBARS e carbonilação de proteínas *in vitro* (Tabela 2 – Artigo 2), sugerindo que a atividade antioxidante do GM1 não é devido a seu efeito antioxidante intrínseco, mas devido à redução secundária da geração de ERs e/ou aumento das defesas antioxidantes. Estes resultados estão de acordo com o estudo de Tyurin e colaboradores (1992) que mostraram que o efeito inibitório do GM1 na produção de TBARS em sinaptossomas é abolido por desnaturação térmica prévia, ou se os lipossomas formados de lipídeos isolados de sinaptossomas cerebrais forem usados, indicando que a integridade da célula é necessária para o GM1 exercer a sua atividade antioxidante. Estes autores também sugerem que o GM1 pode interagir com o sistema de transdução de sinal, pois o efeito antioxidante do GM1 é prevenido pela prévia incubação com a polimixina B, um inibidor de proteína quinases dependente de lipídeos. Nesse contexto, esse conjunto de dados confirma nossos resultados citados anteriormente, que mostraram que o GM1 aumenta a atividade da

CAT no cérebro de ratos *ex vivo*, mas não se o GM1 for adicionado diretamente no homogeneizado cerebral *in vitro*.

Além disso, também foi evidenciado neste estudo uma correlação significativa entre a duração das convulsões e redução na atividade da enzima Na^+, K^+ -ATPase no estriado. Entretanto, não foi evidenciada uma correlação entre as convulsões e o aumento da produção de TBARS e carbonilação protéica induzida pelo AG (Figura 4 – Artigo 2).

Esses resultados sugerem que, apesar da injeção intraestriatal de AG induzir convulsões e um aumento no conteúdo de grupos carbonil protéico no estriado, é difícil postular que haja uma relação causa-efeito entre esses eventos porque: I) o conteúdo de grupos carbonil protéicos representa o total de proteínas carboniladas no estriado, o que não afasta a hipótese de que proteínas específicas, que não representem uma fração significativa dentro do conteúdo de proteínas totais, sejam oxidadas e, seletivamente, se relacionem ao fenômeno convulsivo. Deste modo, a inibição de uma enzima, como a Na^+, K^+ -ATPase por exemplo, poderia estar envolvida na gênese e propagação das convulsões induzidas pelo AG por um mecanismo oxidativo, sem repercutir em um aumento na carbonilação protéica total e na produção de TBARS. II) a administração prévia de MK-801 e DNQX diminuiu o conteúdo de grupos carbonil protéico, mas não protegeu das convulsões induzidas pelo AG, sugerindo que esses eventos podem ser dissociados.

Embora a maioria dos constituintes celulares possa ser alvos das ERs, alguns alvos selecionados podem aumentar a excitabilidade celular e facilitar o aparecimento de convulsões (Patel et al., 2004). A Na^+, K^+ -ATPase é um desses alvos, pois ela é responsável pela manutenção dos gradientes iônicos através da membrana plasmática, e sua inibição causa convulsões em ratos (Jamme et al., 1995). De fato, tem sido descrito que a atividade da Na^+, K^+ -ATPase está diminuída no cérebro de pacientes epiléticos *postmortem* (Grisar et al., 1992) e em modelos experimentais de epilepsia, como a injeção intracerebral de prolina (Pontes et al., 2001), MMA (Malfatti et al., 2003) e PTZ (Oliveira et al., 2004). Além disso, a Na^+, K^+ -ATPase pode ser um possível alvo do AG para causar o aparecimento de atividade convulsiva. Um dos pontos mais relevantes desse estudo foi a demonstração de uma significativa correlação entre a inibição da atividade da Na^+, K^+ -ATPase e a duração das convulsões induzidas pelo AG (Figura 3A – Artigo 2). O tratamento com GM1 preveniu as convulsões e a inibição da atividade da Na^+, K^+ -ATPase induzidas por AG, mantendo a correlação entre esses eventos, ou seja, os animais tratados com GM1 apresentaram menos

convulsões e tiveram uma menor perda de atividade da Na^+, K^+ -ATPase após a injeção de AG (Figura 3B – Artigo 2).

Enquanto o AG pode inibir diretamente a Na^+, K^+ -ATPase, mecanismos indiretos também podem ser responsáveis pela regulação da enzima, como a produção de ERs. De fato, o AG diminui a atividade da Na^+, K^+ -ATPase em culturas neuronais, e essa inibição pode ser prevenida por glutathione (Kolker et al., 2002). Estes dados sugerem que o AG pode modular a atividade da Na^+, K^+ -ATPase por mecanismos redox. Tem sido descrito que a atividade da Na^+, K^+ -ATPase é sensível a ação das ERs, que é capaz de alterar a composição da membrana plasmática (Jamme et al., 1995) e o estado redox de grupos sulfidril, como também, de outros resíduos de aminoácidos (Morel et al., 1998). Além disso, considerando a sensibilidade da Na^+, K^+ -ATPase ao dano induzido pelas ERs e/ou inibição pelo AG, é plausível supor que esta enzima pode ser inibida pela injeção intraestriatal de AG e possa contribuir com a hiperexcitabilidade neuronal relacionada ao AG. Embora nossos dados sugerem que o efeito neuroprotetor do GM1, contra a inibição da Na^+, K^+ -ATPase induzida pelo AG, não seja devido a atividade antioxidante intrínseca daquele glicosfingolípido, estudos avaliando a introdução de grupos carbonil dentro das cadeias laterais da enzima e a modulação dos sítios redox devem ser realizados para esclarecer este ponto. Isto é particularmente importante, pois no presente estudo, a inibição da atividade da Na^+, K^+ -ATPase não se correlacionou com as medidas de carbonilação protéica total e a oxidação lipídica.

Considerando que a administração de GM1 e MK-801 previnem a inibição da Na^+, K^+ -ATPase no cérebro de ratos (Avrova et al., 2002), nós decidimos investigar se os receptores glutamatérgicos ionotrópicos estariam envolvidos na inativação da atividade da Na^+, K^+ -ATPase induzida pelo AG. Os antagonistas de receptor de glutamato, MK-801 e DNQX, não tiveram efeito contra as convulsões e a inibição da Na^+, K^+ -ATPase, sugerindo que estes receptores não estão envolvidos diretamente nos efeitos neurotóxicos induzidos pelo AG.

Desde que tem sido descrito que o muscimol previne as convulsões induzidas pelo AG (Lima et al., 1998), nós decidimos investigar se este agonista de receptor GABA_A poderia prevenir o dano oxidativo e a inibição da Na^+, K^+ -ATPase induzidos pelo AG. O tratamento com muscimol protegeu contra as convulsões (Figuras 2C, 6A e 6B – Artigo 2) e a inibição da Na^+, K^+ -ATPase induzida pelo AG (Tabela 3 – Artigo 2). Interessantemente, a inibição desta enzima no estriado injetado teve uma correlação significativa com a atividade convulsiva (Figura 7A e 7B). Estes dados foram similares aos resultados obtidos com o tratamento com GM1 (Figura 3B), indicando que o muscimol e GM1 podem ter mecanismos de ação

similares ou agir de maneira convergente, que resulta na proteção contra a inibição da atividade da Na^+, K^+ -ATPase induzida pelos episódios convulsivos. Além disso, é importante testar se o GM1 reverte os efeitos do PTZ, um antagonista de receptor GABA_A , para avaliar se o GM1 poderia prevenir os efeitos de um bloqueio agudo da neurotransmissão GABA_A . Como foi descrito anteriormente na seção de resultados, o GM1 preveniu as convulsões e a inibição da Na^+, K^+ -ATPase induzidas pelo PTZ (Figura 9 e Tabela 4 –Artigo 2), sugerindo que a estimulação do sistema GABA_A pode ser um possível mecanismo da neuroproteção do GM1. Entretanto, não se pode descartar a participação de outras vias na neuroproteção induzida pelo GM1, particularmente porque outros compostos, com ação antioxidante, previnem as convulsões e a inibição da atividade da Na^+, K^+ -ATPase induzida pelo bloqueio de receptores GABA_A (Oliveira et al., 2004) e por déficit no metabolismo aeróbico (Royes et al., 2003), provavelmente por agir nos sítios de regulação dos receptores de glutamato e GABA_A .

Além do mecanismo antioxidante e facilitação do sistema GABA_A , outros mecanismos de neuroproteção foram propostos para o gangliosídeo GM1 na literatura. Dentre eles, podemos citar a manutenção da permeabilidade da membrana plasmática, estimulação direta da atividade da Na^+, K^+ -ATPase (Leon et al., 1981; Mahadik et al., 1989), inibição das enzimas fosfolipase A_2 (Weber et al., 1995) e NOS (Wendland et al., 1994), estimulação de fatores neurotróficos e de crescimento neuronal (Hakomori et al., 1981), e a inibição da PKC e sua translocação para a membrana plasmática (Pei et al., 2002). De fato, nós não podemos descartar que os efeitos neuroprotetores do GM1, nas alterações comportamentais e neuroquímicas induzidas pelo AG, possam ser mediados, pelo menos em parte, por um desses mecanismos.

Embora os pacientes com acidemia glutárica apresentem alterações comportamentais e bioquímicas, como convulsões e dano oxidativo compatíveis com o presente modelo experimental, é difícil extrapolar resultados obtidos em animais para o ser humano. Contudo, o papel do GM1 na excitotoxicidade induzida pelo AG, evidenciado no presente estudo, pode ser de grande valia para o entendimento da fisiopatologia desta doença bem como o estabelecimento de novas condutas para o tratamento dos pacientes com acidemia glutárica.

CONCLUSÕES

VI. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos nas avaliações realizadas, pode-se concluir que:

1. A administração sistêmica de GM1 reduziu a quimiluminescência espontânea e aumentou a atividade da CAT, entretanto, não alterou a atividade da SOD e GSH-Px e os níveis de TRAP no córtex de ratos *ex vivo*;
2. A adição de GM1, no meio de incubação, reduziu a atividade da CAT, mas não alterou os valores da quimiluminescência espontânea *in vitro*;
3. A administração de GM1 protegeu contra as convulsões comportamentais e eletrográficas induzidas pelo AG;
4. A injeção intraestriatal de AG *ex vivo*, assim como, a adição de AG ao meio de incubação, aumentaram a carbonilação protéica e a produção de TBARS no estriado de ratos.
5. A administração de GM1 reduziu a carbonilação protéica e a produção de TBARS após a injeção de AG no estriado de ratos *ex vivo*, entretanto, o GM1, adicionado ao meio de incubação, não alterou os níveis de carbonilação protéica e de TBARS induzidos por AG *in vitro*;
6. A injeção intraestriatal de AG reduziu a atividade da Na^+, K^+ -ATPase no estriado de ratos *ex vivo*, e quando adicionado ao meio de incubação *in vitro*;
7. A administração de GM1 protegeu contra a inibição da atividade da Na^+, K^+ -ATPase após a injeção intraestriatal de AG, e quando adicionado no meio de incubação na presença de AG *in vitro*;
8. As convulsões induzidas por AG tiveram uma correlação significativa com a atividade da Na^+, K^+ -ATPase, mas não com os níveis de TBARS e carbonilação protéica no estriado de ratos;
9. O muscimol, mas não o MK-801 e o DNQX, protegeu contra as convulsões e inibição da Na^+, K^+ -ATPase induzida pela injeção de AG no estriado de ratos;
10. A administração sistêmica de GM1 protegeu contra as convulsões, aumento da produção de TBARS, carbonilação protéica e inibição da Na^+, K^+ -ATPase induzida pela injeção de PTZ no estriado de ratos;
11. As convulsões induzidas por PTZ tiveram uma correlação significativa com a inibição da Na^+, K^+ -ATPase no estriado de ratos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VII- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, K.; NAKANISHI, K.; SAITO, H. The possible role of endogenous glutathione as an anticonvulsivant in mice. **Brain Research**, v. 854, p. 235-238, 2000.
- ABÍLIO, V.C., SILVA, R.H., CARVALHO, R.C., et al. Important role of striatal catalase in aging- and reserpine-induced oral dyskinesia. **Neuropharmacology**, v. 47, p.263-72, 2004.
- AGNATI, L. F.; FUXE, K.; ZOLI, M. et al. Effects of neurotoxic and mechanical lesions of the mesostriacal dopamine pathway on striacal polyamine levels in the rat: modulation by chronic ganglioside GM1 treatment. **Neuroscience Letters**, v. 61, p. 339-344, 1985.
- ALBERTSON, T.E. AND WALBY, W.F.,. The effect of exogenous GM1 ganglioside on kindled-amygdaloid seizures. **Neuropharmacology**. v.26, p. 261-264, 1987.
- ALMEIDA, A; HEALES, S. J. R.; BOLAÑOS, J. P. et al. Glutamate neurotoxicity is associated with nitric oxide-mediated mitochondrial dysfunction and glutathione depletion. **Brain Research**, v. 790, p. 209-216, 1998.
- AMATO, A., CONNOLLY, C.N., MOSS, S.J., SMART, T.G.Modulation of neuronal and recombinant GABAA receptors by redox reagents. **Journal of Physiology**, v.517, p. 35-50, 1999.
- AMES III, A. CNS energy mmetabolism as related to function. **Brain Research Reviews**, v. 34, p. 42-68, 2000.
- ANDO, S. Gangliosides and related sialyl compounds as modulators of synaptic functions. In: **Sphingolipids as signaling modulators in the nervous system**, p. 33, 1997.
- ANDO, S.; CHANG, N. C.; YU, R. K. High-performance thin-layer chromatography and

- densitometric of brain ganglioside composition of several species. **Analytical Biochemistry**, v. 89, p. 437-450, 1978.
- ARIGA, T., JARVIS, W. D., & YU, R. K. Role of sphingolipid-mediated cell death in neurodegenerative diseases. **Journal of Lipid Research**, v. 39, p. 1-16, 1998.
- ARMSTRONG, D. L. Calcium channel regulation by calcineurin, a Ca^{2+} -activated phosphatase in mammalian brain. **Trends in Neuroscience**, v. 12, p. 117-122, 1989.
- AVROVA, N.F., VICTOROV, I.V., TYURIN, V.A., et al., 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. **Neurochemical Research**, v.23, p. 945-952, 1994.
- BARREIRO, A., REY, A., GONZÁLEZ, G., et al. Aciduria Glutárica tipo I: Descripción del primer caso clínico nacional. **Revista Médica del Uruguay**, v.20, p.221-227, 2004.
- BARRIVIERA, M.L., LOURO, S.R.W., WAJNBERG, E., HASSON-VOLOCH, A. Denervation alters protein-lipid interactions in membrane fractions from electrocytes of *Electrophorus Electricus*. **Biophysic Chemistry**, v. 91, p. 93-104, 2005.
- BECKMAN, J.S. The physiological and pathological chemistry of nitric oxide. In: Lancaster J, ed. **Nitric oxide principles and actions**. San Diego: Academic Press, v. 7, 1996.
- BECKMAN, J. S., BECKMAN, T. W., CHEN, J. et al. Apparent radical hydroxy radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. **Proceedings of The National Academy of Sciences USA**, v. 87, p. 1621-1624, 1990.
- BELLATO, P., MILAN, F., TOFFANO, G. Disposition of exogenous tritium-labelled GM1 monosialoganglioside in the rat. **Journal Clinical Trials**, v. 26, p. 39, 1989.
- BENNET, J.P., LOGAN, W.J., SNYDER, S.H. Amino acids as central nervous transmitters:

- the influence of ions, amino acid analogues, and ontogeny on transport systems for L-glutamic and L-aspartic acids and glycine into central nervous synaptosomes of the rat. *Journal Neurochemistry*, v. 21, p. 1533-1550, 1973.
- BERGENDI, L., BENES, L., DURACKOVA, Z., et al. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sciences*, v.65, p. 1865-1874, 1999.
- BIGAMI A., PALLADINI C. AND VENTURINI G. Effect of cardiazol on sodium-potassium adenosinetriphosphatase of the rat brain *in vivo*. **Brain Research**, v. 1, p.413-414, 1966.
- BJUGSTAD, K.B., GOODMAN, S.I., FREED, C.R. Age of symptom onset predicts severity of motor impairment and clinical outcome of glutaric acidemia type 1. **Journal of Pediatric**, v.137, p. 681–686, 2000.
- BOVERIS, A. & CHANCE, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide: general properties and effect of hyperbaric oxygen. **Journal of Biochemistry**, v. 134, p. 707-716, 1973.
- BOVERIS, A. Biochemistry of free radicals: from electrons to tissues. **Medicina (Buenos Aires)**, v. 58, p. 350-356, 1998.
- BRORSON, J. R.; MARCUCCILLI, C. J.; MILLER, R. J. Delayed antagonism of calpain reduces excitotoxicity in cultured neurons. **Stroke**, v. 26, p. 1259-1267, 1995.
- BROWN, R.K., AND KELLY. F.J. PEROXIDES AND OTHER PRODUCTS. In: Punchard, N.A. and Kelly, F.J. (Eds.), **Free Radicals**, A practical approach. Oxford University Press, New York, pp. 119-131, 1996.
- BRUNBECH, L. & SABERS, A. Effects of antiepileptic drugs on cognitive function in individuals with epilepsy: a comparative review of newer versus older agents. **Drugs**, v. 62, p. 593-604, 2002.
- BURTON, K. P. Evidence of direct toxic effects of free radicals on the myocardium. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 4, p. 15-24, 1988.

- BUTTERFIELD, D.A. & KANSKI, J. Brain protein oxidation in age-related neurodegenerative disorders that are associated with aggregated proteins. **Mechanism of Ageing and Development**, v. 122, p. 945-962, 2001.
- CAO, G.; SOFIC, E.; PRYOR, R. L. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. **Free Radicals Biology & Medicine**, v. 22, nº 5, p. 749-760, 1997.
- CAROLEI, A.; FIESCHI, C.; BRUNO, V. et al. Monosialoganglioside GM1 in cerebral ischemia. **Cerebrovascular and Brain Metabolism Reviews**, v. 3, p. 134-157, 1991.
- CASAMENTI, F., Di PATRE, P. L., MILAN, F. et al. Effects of nerve growth factor and GM1 ganglioside on the number and size of cholinergic neurons in rats with unilateral lesion of the nucleus basalis. **Neuroscience Letters**, v. 103, p. 87-91, 1989.
- CASSARINO, D. S. & BENNET JR., J. P. Na evaluation of the role of mitochondria in neurodegenerative diseases: mitochondrial mutations and oxidative pathology, protective nuclear responses, and cell death in neurodegeneration. **Brain Research Reviews**, v. 29, p. 1-25, 1999.
- CASTRO, L., RODRIGUES, M., RADI, R. Aconitase internados readily inactivated by peroxynitrite, but not by its precursor, nitric oxide. *Journal Biological Chemistry*, v.269, p. 29409-29415, 1994.
- CHALMERS, R.A, PURKISS, P., WATTS, R.W., LAWSON, A.M. Screening for organic acidurias and amino acidopathies in newborns and children. **Journal Inherited Metabolic Disease**, v.3, p.27-43, 1980.
- CHAN, P.H, FISHMAN, R.A, LEE, J.L., CANDELISE, L. Effects of excitatory neurotransmitter amino acids on swelling of rat brain cortical slices. **Journal Neurochemistry**, v.33, p.1309-1315, 1979.
- CHANCE, A.; SIES, H.; BOVERIS, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiology Review**, v. 59, p. 527-605, 1979.

- CHAMPNEY, T.H.; HANNEMAN, W.H.; LEGARE, M.E.; APPEL, K. Acute and chronic effects of melatonin as an anticonvulsant in male gerbils. **Journal of Pineal Research**, v. 20, p. 79-83, 1996.
- CLERICO A.; GIAMPIETRO O. Is the endogenous digitalis-like factor the link between hypertension and metabolic disorders as diabetes mellitus, obesity and acromegaly? Review. **Clinical Physiology & Biochemistry**, v. 8, p. 153-168, 1990.
- CHRISTENSEN E, BRANDT NJ. Studies on glutaryl-CoA dehydrogenase in leucocytes, fibroblasts and amniotic fluid cells. The normal enzyme and the mutant form in patients with glutaric aciduria. **Clinica Chimica Acta**, v.88, p. 267-276, 1978.
- COYLE, J. T. & PUTTERFACKEN, P. Oxidative stress, glutamate and neurodegenerative disorders. **Science**, v. 264, p. 689-695, 1993.
- DAL TOSO, R.; SKAPER, S. D.; FERRARI, G. et al. 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.
- DAVOLIO, C. & GREENAMYRE, J. T. Selective vulnerability of the CA1 region of hippocampus to the indirect excitotoxic effects of malonic acid. **Neuroscience Letters**, v. 192, p. 29-32, 1995.
- DAWSON, V. L. & DAWSON, T. M. Free radicals and neuronal cell death. **Death and Differentiation**, v. 3, p. 71-78, 1996.
- DEFEUDIS, F. V., YUSUFI, A. N. K., OSSOLA, L., et al. Antiserum to gangliosides inhibits [³H] GABA binding to a synaptosome-enriched fraction of rat cerebral cortex. **Genetic Pharmacology**, v. 2, p. 251-254, 1979.

- DEL MAESTRO, R. F. An approach and to free radicals in medicine and biology. **Acta Physiologica Scandinavica Supplementum**, v. 492, p.153-167, 1980.
- DE MELLO, C. F.; BEGNINI, J.; JIMÉNEZ-BERNAL, R. E. et al. Intrastratial Methylmalonic acid administration induces rotational behavior and convulsions through glutamatergic mechanisms. **Brain Research**, v. 721, p. 120-125, 1996.
- DI PATRE, P. L., ABBAMONDI, A., BARTOLINI, L. et al. GM1 ganglioside counteracts cholinergic and behavioral deficits induced in the rat by intracerebral injection of vincristine. **European Journal Pharmacology**, v. 162, p. 43-50, 1989.
- DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cells function. **Phisyology Review**: v. 82, p.47-95, 2002.
- EL-MALLAKH R.S.; BARRETT R.L.; WYATT R.J. The Na⁺-K⁺-ATPase hypothesis for bipolar disorder: implications for normal development. **Journal Child Adolescent Psychopharmacology**, v. 3, p. 37-52, 1993.
- ESTERBAUER, H.; KOLLER, E.; SLEE, R. G. et al. Possible involvement of the lipid-peroxidation product 4-hydroxynonenal in the formation of fluorescent chromolipids. **Journal of Biochemistry**, v. 239, p. 405-409, 1986.
- FARIA, R. R., ABÍLIO, V.C., GRASSL, C., et al. Beneficial effects of vitamin C and vitamin E on reserpine-induced oral dyskinesia in rats: critical role of striatal catalase activity. **Neuropharmacology**, v. 48, p. 993-1001, 2005.
- FAZZINI, E.; DURSO, R.; DAVOUDI, H. et al. GM1 gangliosides alter acute MPTP-induced behavioral and neurochemical toxicity in mice. **Journal Neurology Science**, v. 99, p. 59-68, 1990.
- FENTON, W. A. & ROSEMBERG, L. E. Disorders of propionate and methylmalonate

- metabolism. In: **The Metabolic Basis of Inherited Disease**, 7^a ed, New York, McGraw-Hill, p. 1423-1449, 1995.
- FERRARI, G.; ANDERSON, B. L.; STEPHENS, R. M. et al. Prevention of apoptotic neuronal death by GM₁ ganglioside. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n° 7, p. 3074-3080, 1995.
- FIGHERA, M. R.; QUEIROZ, C. M.; STRACKE, M. P. et al. Ascorbic acid and α -tocopherol attenuate methylmalonic acid-induced convulsions. **NeuroReport**, v. 10, p. 2039-2043, 1999.
- FIGHERA, M.R., BONINI, J.S., OLIVEIRA, T.G., et al. GM1 Ganglioside attenuates convulsions and Thiobarbituric acid reactive substances production induced by the intrastriatal injection of methylmalonic acid. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.35, p. 465-473, 2003.
- FISHER R.S.; PEDLEY T.A.; MOODY W.J. AND PRINCE D. A. The role of extracellular potassium in hippocampal epilepsy. **Archieve of Neurology**, v. 33, p.76-83, 1976.
- FISCHER, A.B. Intracellular production of oxygen-derived free radicals. **Proceedings of a Book Lodge Symposium**, Augusta, Apr. 27-29, p.99-104, 1987.
- FOOTE, C. S. Quenching of singlet oxygen. In: **Singlet Oxygen**, edited by H. H. Wasserman and R. W. Murray. New York: Academic, 1979, p. 139-171.
- FORFIA, P.R., HINTZE, T.H., WOLIN, M.S., et al. Role of nitric oxide in the control of mitochondrial function. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 471, p. 381-388, 1999.
- FORMAN, D. S. & LEDEEN, R. W. Axonal transport of gangliosides in the goldfish optic nerve. **Science**, v. 117, p. 630-634, 1972.

- FRIDOVICH, I. Superoxide dismutases. **Annual Review Biochemistry**, v. 44, p. 147-159, 1975.
- FRIDOVICH, I. Oxygen radicals, hydrogen peroxide and oxygen toxicity. In Free radicals in biology (Pryor, W.A. ed.) Academic Presss, N.Y., p. 239-277, 1976.
- FRIDOVICH, I. The biology of oxygen radicals. **Science**, v. 201, p. 875-880, 1978.
- GAETANI, G. F.; GALIANO, S.; CANEPA, L. et al. Catalase and glutathione peroxidase are equally active in detoxification of hydrogen peroxide in human erythrocytes. **Blood**, v. 73, p. 334-339, 1989.
- GAROFALO, L. & CUELLO, A. C. Nerve growth factor and the monosialoganglioside GM1 modulate cholinergic markers and affect behavior of decorticated adult rats. **European Journal Pharmacology**, v. 183, p. 934-935, 1990.
- GEISLER, F. H.; DORSEY, F. C.; COLEMAN, W. P. Recovery of motor function after spinal cord injury – a randomized, placebo-controlled trial with gm1 ganglioside. **New England Journal of Medicine**, v. 324, p. 1829-1838, 1991.
- GONATAS, N. K.; STIEBER, A.; GONATAS, J. Endocytosis of exogenous GM₁ ganglioside and cholera toxin by neuroblastoma cells. **Molecular Cellular Biology**, v. 3, p. 91-101, 1983.
- GOODMAN SI, NORENBERG MD, SHIKES RH, et al. Glutaric aciduria: biochemical and morphologic considerations. **The Journal of Pediatrics**, v. 90, p. 746-50, 1977.
- GOODMAN, S.I., BIERY, B.J. Glutaric acidemia (type 1). **Mental Retard Development and Disability Research**, Review, v.2, p.155– 159, 1996.
- GOODMAN, S.I, FRERMAN, F.E. Organic acidemias due to defects in lysine oxidation: 2-keto acidemia and glutaric acidemia. In: Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D. (Eds.). **The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease**. McGraw-

Hill, New York 2001; 1451-60.

GREENE, J. G. & GREENAMYRE, J. T. Characterization of the excitotoxic potential of the reversible succinate dehydrogenase inhibitor malonate. **Journal of Neurochemistry**, v. 64, p. 430-436, 1996.

GRISAR, T., GUILLAUME, D., DELGADO-ESCUETA, A.V. Contribution of Na⁺,K⁺-ATPase to focal epilepsy: a brief review. **Epilepsy Research**, v. 12, p. 141-149, 1992.

GUPTA, Y.K.; BRIYAL, S.; CHAUDHARY, G. Protective effect of trans-resveratrol against kainic acid-induced and oxidative stress in rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behaviour**, v. 71, p. 253-257, 2002.

HADJICONSTANTINO, M.; ROSSETI, R. C.; PAXTON, R. C. et al. Administration of GM1 ganglioside restores the dopamine content in striatum after chronic treatment with MPTP. **Neuropharmacology**, v. 25, n° 9, p. 1075-1077, 1986.

HADJICONSTANTINO, M. & NEFF, N. H. Differential recovery of dopamine synthetic enzymes following MPTP and the consequences of GM₁ ganglioside treatment. **European Journal Pharmacology**, v. 181, p. 137-139, 1998.

HAKOMORI, S. I. Glycosphingolipids in cellular interaction differentiation, and oncogenesis. **Annual Review of Biochemistry**, v. 50, p. 733-764, 1981.

HAKOMORI, S.I.; IGARASHI, Y.; NOJIRI, H., et al. Bioactive gangliosides modulation transmembrane signaling. In: Horrocks, L.A. et al. (eds.), **Trophic Factors and the Nervous System**, p.135-158, Raven Press, New York, 1990.

HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J. M. C. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: Some problems and concepts. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 146, p. 501-514, 1986.

HALLIWELL, B. Tell me about free radicals, doctor: a review. **Royal Society of Medicine**, v. 82, p.747-752, 1989.

- HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J. M. C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 1-63, 1990.
- HALLIWELL, B. Reactive oxygen species and the central nervous system. **Journal of Neurochemistry**, v. 59, p. 1609-1623, 1992.
- HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: a personal view. **Nutrition Reviews**, v. 52, p. 253-280, 1994.
- HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J. C. In: **Free radicals in biology and medicine**, 3^a ed., New York, Oxford University Press, 1999.
- HANSSON, H.A., HOLMGREN, L., SVENNERHOLM, L. Ultrastructural localization of cells membrane GM1 ganglioside by cholera toxin. **Proceedings of National Academy of Sciences USA**, v. 74, p. 3782-3786, 1977.
- HARMONY T., URBA-HOLMGREN R., URBAY C.M. AND SZVA S. Na⁺-K⁺-ATPase activity in experimental epileptogenic foci. **Brain Research**, v. 11, p. 672-680, 1968.
- HARRIS, M. E.; CARNEY, J. M.; COLE, P. S. et al. β -amyloid peptide-derived, oxygen-dependent free radicals inhibit glutamate uptake in cultured astrocytes: implications for Alzheimer's disease. **NeuroReport**, v. 6, p. 1875-1879, 1995.
- HEFFNER, J. E. & REPINE, J. E. Pulmonary strategies of antioxidant defense. **American Reviews Respiratory Disease**, v. 140, p. 531-554, 1989.
- HOFFMANN, P. L., IORIO, K.R., SNELL, L.D., TABAKOFF, B. Attenuation of glutamate-induced neurotoxicity in chronically ethanol-exposed cerebellar granule cells by NMDA receptor antagonists and ganglioside GM1. **Alcohol Clinic Experimental Research** v.19, p.721-726, 1995.
- HOFFMANN, G.F., ATHANASSOPOULOS, S.; BURLINA, A.B; et al. Clinical course, early diagnosis, treatment, and prevention of disease in glutaryl-CoA dehydrogenate deficiency. **Neuropediatrics**, v. 27, p.115-123, 2001.

- HUANG W.H.; WANG Y. AND ASKARI A. Na^+, K^+ -ATPase: inactivation and degradation induced by oxygen radicals **International Journal of Biochemistry**, v. 24, p. 621-626, 1992.
- HUCKMAN, T. D.; SUTPHIN, M. S., MITROVIC. Oxidative stress in a clonal cell line of neuronal origin: effects of antioxidant enzyme modulation. **Journal of Neurochemistry**, v. 60, p. 2046-2058, 1993.
- JACKSON, G. R., SAMPATH, D., WERRBACH-PEREZ, K. et al. Effects of nerve growth factor on catalase and glutathione peroxidase in a hydrogen-peroxidase-resistant pheochromocytoma subclone. **Brain Research**, v. 634, p. 69-76, 1994.
- JAIN S. K.; LIM G. Pyridoxine and pyridoxamine inhibits superoxide radicals and prevents lipid peroxidation, protein glycosylation, and $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase activity reduction in high glucose-treated human erythrocytes. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 30, p. 232-237, 2001.
- JAMME, I., PETIT, E., DIVOUX, D. Modulation of mouse cerebral Na^+, K^+ -ATPase activity by oxygen free radicals. **Neuroreport**, v.7, p. 333–337, 1995.
- JENNER, P., OLANOW, C.W. Oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease. **Neurology**, v. 47, p.161-170, 1996.
- JORGENSEN P.L. Structure, function and regulation of $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPase in the kidney. **Kidney International**, v. 29, p. 10-20, 1986.
- KABUTO, H.; YOKOI, I.; OGAWA, N. Melatonin inhibits iron-induced epileptic discharges in rats by suppressing peroxidation. **Epilepsia**, v. 39, p. 237-243, 1998.
- KARPIAK, S. E. Ganglioside treatment improves recovery of alternation behavior after unilateral entorhinal cortex lesion. **Experimental Neurology**, v. 81, p. 330-339, 1983.
- KARPIAK, S. E. & MAHADIK, S. P. Enhanced cortical maturation: gangliosides a in CNS

- plasticity. **Progress in Brain Research**, v. 85, p. 299-309, 1990.
- KARPIAK, S. E., GRAF, L. & RAPPORT, M.M. Anti-serum to brain gangliosides produces recurrent epileptiform activity. **Science**, v. 121, p. 735-737, 1976.
- KARPIAK, S. E., MAHADIK, S.P., GRAF, L. & RAPPORT, M.M. An immunological model of epilepsy: seizures induced by antibodies to GM1 ganglioside. **Epilepsia**, v.22, p. 189-196, 1981.
- KARPIAK, S.E., VILIM, F., MAHADIK, S.P. Gangliosides accelerate rat neonatal learning and levels of cortical acetylcholinesterases. **Developmental Neuroscience**, v. 6, p. 127-135, 1984.
- KASARKIS, E. J.; KARPIAK, S. E.; RAPPORT, M. M., et al. Abnormal maturation of cerebral cortex and behavioral deficit in adult rats after neonatal administration of antibodies to ganglioside. **Brain Research**, v. 227, p. 25-35, 1981.
- KATOH-SEMBA, R., SKAPER, S. D., VARON, S. Interaction of GM1 ganglioside with PC12 pheocromocytoma cells: serum and NGF-dependent effects on neuritic growth (and proliferation). **Journal of Neuroscience Research**, v. 12, p. 299-310, 1984.
- KAUR J., SHARMA D., SINGH R. Acetyl-L-carnitine enhances Na⁺-K⁺-ATPase glutathione-S-transferase and multiple unit activity and reduces lipid peroxidation and lipofuscin concentration in aged brain regions. **Neuroscience Letters**, v. 301, p.1-4, 2001.
- KOECHLIN, B. Preparation and properties of serum and plasma proteins. The metal-combining proteins of human plasma. **Journal of the American Chemical Society**, v. 74, p. 2629-2653, 1952.
- KÖLKER, S., AHLEMEYER, B., KRIEGLSTEIN, J., HOFFMANN, G.F. Maturation-dependent neurotoxicity of 3-hydroxyglutaric and glutaric acids *in vitro*: A new pathophysiologic approach to glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. **Pediatric Research**, v. 47, p. 259-262, 2000.

- KÖLKER S, AHLEMEYER B, KRIEGLSTEIN J, HOFFMANN GF. Contribution of reactive oxygen species to 3-hydroxyglutarate neurotoxicity in primary neuronal cultures from chick embryo telencephalons. **Pediatric Research**, v. 50, p.76–82, 2001.
- KÖLKER, S., OKUN, J.G., AHLEMEYER, B., et al. Chronic treatment with glutaric acid induces partial tolerance to excitotoxicity in neuronal cultures from chick embryo telencephalons. **Journal of Neuroscience Research**, v. 68, p. 424–431, 2002.
- KORUMBO, W. J.; TRUSH, M. A.; KENSLER, T. W. Glutathione peroxidase activity in tumor promotion? **Chemico-Biological Interactions**, v. 54, p. 199-207, 1985.
- KOWALTOWSKI, A.J., CASTILHO, R.F., VERCESI, A.E. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. **FEBS Letters**, v. 495, p.12-15, 2001.
- KREIHLSTEIN, H.& OBERPICHLER-SCHWENK, H. The role of oxygen radicals in ischemic brain damage: free radicals production, protein oxidation and tissue dysfunction. In: **Pharmacology of Cerebral Ischemia**, Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 1992, p. 321- 331.
- KRINSKY, N. I. Biological roles of singlet oxygen. In: **Singlet oxygen**, edited by H. H. Wasserman and R. W. Murray. New York: Academic, p. 597-641, 1979.
- KYLERMAN. M; SKEJELDAL,O.H.; LUNDBER, M; HOLME, I; JELLUM, E; VON DOBLEN, U.; FOSSEN, A.; CARLSSON, G. Dystonia and dyskinesia in glutaric aciduria type I: clinical heterogeneity and therapeutic considerations, **Movement Disorder Society**, v.9, p.22-30, 1994.
- LAJTHA, A. ed. Gangliosides. In: **Handbook of Neurochemistry**, Vol. 3, New York, Plenum Press, 1983, p. 41-90.
- LEDEEN, R. W. & YU, R. K. Gangliosides; structure, isolation and analysis. In: Ginsburg, V. (ed.), **Methods in Enzymology**, v. 33, p. 139-191, Academic Press, New York, 1982.
- LEDEEN, R. W. Biology of gangliosides: neuritogenic and neuronotrophic properties.

Journal Neuroscience Research, v. 12, p. 147-159, 1984.

LEIBEL RL, SHIH VE, GOODMAN SI, et al. Glutaric acidemia: a metabolic disorder causing progressive choreoathetosis. **Neurology**, v. 30, p.1163–1168, 1980.

LEVINE RL, GARLAND D, OLIVER CN, et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Method of Enzymology**, v. 186, p. 464-478, 1990.

LIMA, T.T.F., BEGNINI, J., DE BASTIANI, J., RIBEIRO, M.C., DE MELLO, C.F. Pharmacological evidence for GABAergic and glutamatergic involvement in the convulsant and behavioral effects of glutaric acid. **Brain Research**, v. 802, p.55-60, 1998.

LIU, T. H.; BECKMAN, J. S.; FREEMAN, B. A. et al. Polyethylene glycol-conjugated superoxide dismutase and catalase reduce ischemic brain injury. **American Journal of Physiology**, v. 256, p. 589-593, 1989.

LIU, D., WEN, J., LIU, J., LI, L. The roles of free radicals in amyotrophic lateral sclerosis: reactive oxygen species and elevated oxidation of protein, DNA and membrane phospholipids. **FASEB Journal**, v.13, p. 2318-2328, 1999.

LOMBARDI, G., ZANONI, R., MORONI, F. Systemic injection of GM1 ganglioside reduces quinolinic acid-induced striatal lesions in the rat. **European Journal Pharmacology**, v. 174, p.123-125, 1989.

MACHLIN, L. J. & BENDICH, A. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. **Journal FASEB**, v. 1, p. 441-445, 1987.

MADL, J. E. & BURGESSER, K. Adenosine triphosphate depletion reverses sodium-dependent, neuronal uptake of glutamate in rat hippocampal slices. **The Journal of Neuroscience**, v. 13, p. 4429-4444, 1993.

MAHADIK, S. P.; HAWVER, D. B.; HUNGUND, B. L. et al. GM₁ ganglioside treatment

- after global ischemia protects changes in membrane fatty acids and properties of Na⁺, K⁺-ATPase, and Mg²⁺-ATPase. **Journal Neuroscience Research**, v. 24, p. 402-412, 1989.
- MAHADIK, S. P. & KARPIAK, S. E. GM1 ganglioside enhances neonatal cortical development. **Neurotoxicology**, v. 7, n° 2, p. 161-168, 1986.
- MAHADIK, S. P. & KARPIAK, S. E. Gangliosides in treatment of neural injury and disease. **Drug Development Research**, v. 15, p. 337-360, 1988.
- MAIORINO, M.; GREGOLIN, C.; URSIN, F. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 448-457, 1990.
- MALFATTI, C.R., ROYES, L.F.F., FRANCESCATO, L., et al. Intrastratial methylmalonic acid administration induces convulsions and TBARS production, and alters Na⁺,K⁺-ATPase activity in the rat striatum and cerebral cortex. **Epilepsia**, v.44, p. 761-767, 2003.
- MARISCO, P.C., RIBEIRO, M.C., BONINI, J.S., et al. Ammonia potentiates methylmalonic acid-induced convulsions and TBARS production. **Experimental Neurology**, v. 182, p. 455-460, 2003.
- MARGOLIS, R.U. & MARGOLIS, R. K. eds. Structure localization of brain gangliosides. In: **Neurobiology of Glycoconjugates**, New York, Plenum, 1989, p. 1-41.
- MATINYAN, N.S., MELIKYAN, G.B., ARAKELYAN, V.B, et al. Interaction of ganglioside-containing planar bilayers with serotonin and inorganic cations. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 984, p.313-318, 1989.
- MATSUYAMA, T., SHIMIZU, S., NAKASUMA H. et al. Effect of recombinant superoxide dismutase on manganese superoxide dismutase gene expression in gerbils after ischemia. **Stroke**, v. 25, n° 7, p. 1417-1424, 1994.

- MAULIK, N., DAS, D. K., GOGINENI, M. et al. Reduction of myocardial ischemic reperfusion injury by sialylated glycosphingo lipids, ganglioside. **Jornal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 22, p. 74-81, 1993.
- McCORD, J. M. Oxygen-derived radicals: A link between reperfusion and inflammation. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 46, p. 2402-2406, 1987.
- McDONALD, J.W. & SCHOEPP, D.D. Aminooxyacetic acid produces excitotoxic brain injury in neonatal rats. **Brain Research**, v. 624, p. 239-244, 1993.
- MEERSON, F.Z., KAGAN, V.E., KOSLOV, Y.P., et al. The role of lipid peroxidation in pathogenesis of ischemia damage and the antioxidant protection of the heart. **Basic Research Cardiology**, v. 77, p. 465-485, 1982.
- MELDRUN, B.S. Why and when are seizures bad for the brain? **Pharmacology Science**, v. 22, p. 445-446, 2001.
- MENEGHINI, R. A toxicidade do oxigênio. **Ciência Hoje**, v. 5, p. 57-62, 1987.
- MILJAN, E.A., BREMER, E.G. Regulation of growth factor receptors by gangliosides. *Science STKE. Review*, v.26, p.1-10, 2002.
- MILLS, G. C. Glutathione peroxidase and the destruction of hydrogen peroxidase in animal tissues. **Archives of Biochemistry Biophysics**, v. 86, p. 1-5, 1960.
- MILTON, N.G.N. Inhibition of catalase activity with 3-amino-triazole enhances the cytotoxicity of the Alzheimer's amiloide- β peptide. *Neurotoxicology*, v. 22, p. 767-774, 2001.
- MISHRA, O.P., DELIVORIA-PAPADOPOULOS, M., CAHILLANE, G., WAGERLE, L.C. Lipid peroxidation as the mechanism of modification of the affinity of the Na^+ , K^+ -ATPase active sites for ATP, K^+ , Na^+ , and strophanthidin in vitro. **Neurochemistry Research**, v.14, p.845-851, 1989.

- MOREL, P., TALLINEAU, C., PONTCHARRAUD, R., et al. Effects of 4-hydroxynonenal, a lipid peroxidation product, on dopamine transport and Na⁺,K⁺-ATPase in rat striatal synaptosomes. *Neurochemical International*. v.33, p. 531-540, 1998.
- MORENO, S., MUGNAINI, E., CERU, M.P. Immunocytochemical localization of catalase in the central nervous system of the rats. **Journal of Histochemistry and Citochemistry**, v. 43, p.1253-1267, 1995.
- MOSS, J., FISHMAN, P. H., MANGANIELLO, V. C. Functional incorporation of ganglioside into intact cells: Induction of cholera toxin responsiveness. **Proceedings of National Academy of Science**, v. 73, p. 1034-1037, 1976.
- MURIEL, C., CATANEDA, M., ORTEGA, F. Insights into the mechanism of erythrocyte Na⁺, K⁺-ATPase inhibition by nitric oxide and peroxynitrite anion. **Journal Appl. Toxicology**, v. 23, p. 275-278, 2003.
- MURIEL, P., SANDOVAL, G. Nitric oxide and peroxynitrite anion modulate liver plasma membrane fluidity and Na⁺, K⁺-ATPase by nitric oxide. **Biology Chemical**, v. 4, p.333-342, 2003.
- MUTOH, T.; TOKUDA, A.; MIYADAI, T. Ganglioside GM₁ binds to the Trk protein and regulates receptor function. **Proceedings of The National Academy of Science USA**, v. 92, p. 5087-5091, 1995.
- NISTICO, G., CIRIOLO, M. R., FISKIN, K. et al. NGF restores decrease in catalase activity and increases superoxidase dismutase and glutathione peroxidase activity in the brain of aged rats. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 12, p. 177-181, 1992.
- OBERHOLZER, V.G., LEVIN, B., BURGESS, E.A., YOUNG, W.F. Methylmalonic aciduria. An inborn error of metabolism leading to chronic metabolic acidosis. **Archives of Disease in Childhood**, v. 42, p.492-504, 1967.
- OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for peroxides in animal tissues by

- thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, p. 351-358, 1979.
- OGUNMEKAN, A.P. Vitamin E deficiency and seizures in animal and man. **The Canadian Journal of Neurological Sciences**, v. 6, p. 43-45, 1979.
- OLIVEIRA MARQUES, F., HAGEN, M.E.K., PEDERZOLLI, K.D., et al. Glutaric acid induces oxidative stress in vitro. **Brain Research**, v. 964, p.153-158, 2003.
- OLIVEIRA, M.S., FURIAN, A.F., ROYES, L.F.F., FIGHERA, M.R. et al. Ascorbate Modulates Pentylentetrazol-Induced Convulsions Biphasically. **Neuroscience**, v. 128, p. 721-728, 2004.
- PACKER, L., HIRAMATSU, M., YOSHIKAWA, T. Electron spin resonance-compute tomography: Brain imaging and epilepsy. In: **Free Radicals in Brain Physiology and Disorders**, 185-195, San Diego, Academic Press, 1996.
- PAL, B. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiological Reviews**, v. 74, p. 139-162, 1994.
- PATEL, M. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress: cause and consequence of epileptic seizures. **Free Radical Biology & Medicine**, v.29, p.1951-1962, 2004.
- PAVLAKOVIC, G., EYER, C. L., ISOM, G. E. Neuroprotective effects of PKC inhibition against chemical hypoxia. **Brain Research**, v. 676, p. 205-211, 1995.
- PERRY, G., TADDEO, M.A., PETERSEN, R.B., et al. Oxidative damage in Alzheimer disease. **Biomettals**, v.16, p.77-81, 2003.
- PIERRE S., JAMME I., DROY-LEFAIX M., NOVELOT A., MAIXENT J. *Ginkgo Biloba* extract (Egb 761) protects Na⁺-K⁺-ATPase activity during cerebral ischemia in mice. **NeuroReport**, v. 10, p. 47-51, 1999.
- PEDLEY T.A., FISHER R.S., FUTAMACHI K.J., OJEMANN G.A. Human epileptic brain Na⁺-K⁺-ATPase activity and phenytoin concentrations. **Archives of Neurology**. V. 32, p. 549-554, 1975.

- POON, H. F., FRASIER, M., SHREVE, N., et al. Mitochondrial associated metabolic proteins are selectively oxidized in A30P A-synuclein transgenic mice - a model of familial Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease*, v.18, p. 492-498, 2005.
- PORCIUNCULA, L.O., DAL-PIZZOL, A., COITINHO, A.S., et al. Inhibition of synaptosomal [H-3] glutamate uptake and [H-3] glutamate binding to plasma membranes from brain of young rats by glutaric acid in vitro. ***Neurochemistry International***, v.173, p.93-96, 2000.
- PORCIUNCULA, L.O., EMANUELLI, T., TAVARES, R.G., et al. Glutaric acid stimulates glutamate binding and astrocytic uptake and inhibits vesicular glutamate uptake in forebrain from young rats. ***Neurochemistry International***, v.45, p.1075–1086, 2004.
- PRATICÓ, D. & DELANTY, N. Oxidative injury in diseases of central nervous system; focus on Alzheimer's disease. ***American Journal of Medicine***, v. 109, p. 577-585, 2000.
- PUNCHARD, N. A. & KELLY, F. J. Free radicals: a practical approach. Oxford, University Press, New York, 1996.
- PUNTARULO, S., STOYANOVSKY, D.A. AND CEDERBAUM, A. Interaction of 1-Hydroxietil radical with antioxidants enzymes. ***Archives of Biochemistry and Biophysics***, v.15, p.355-359, 1999.
- RABIN, S. J. & MOCCHETTI, I. GM1 ganglioside activates the high-affinity nerve growth factor receptor Trk A. ***Journal of Neurochemistry***, v. 65, p. 347-354, 1995.
- RADI, R., RODRIGUEZ, M., CASTRO, L. & TELLERI, R. Inhibition of mitochondrial electron transport by peroxynitrite. ***Archives in Biochemistry and Biophysics***, v. 308, p. 89-95, 1994.
- RAITERI, M.; VERSACE, P.; MARCHI, M. GM₁ monosialoganglioside inner ester induces

- early recovery of striatal dopamine uptake in rats with unilateral nigrostriatal lesion. **European Journal Pharmacology**, v. 118, p. 347-350, 1985.
- RAITERI, M.; BONANNO, G.; PENDE, M. GM₁ ganglioside treatment promotes recovery of electrically-stimulated [³H]dopamine release in striatal slices from rats lesioned with kainic acid. **Neuroscience Letters**, v. 136, p. 127-130, 1992.
- RAMASSAMY, C., AVERILL, D., BEFFERT, U., et al. Oxidative Insults Are Associated with Apolipoprotein E Genotype in Alzheimer's Disease Brain. **Neurobiology of Disease**, v. 7, p. 23-37, 2000.
- RAUCA, C., ZERBE, R., JANTZE, H. Formation of free hydroxyl radicals after pentylenetetrazol – induced seizure and kindling. **Brain Research**, v. 847, p. 347-351, 1999.
- REITER, R.J. 1995. Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. **FASEB**, v. 9, p. 526–553, 1995.
- RIBEIRO, M.C., DE ÀVILA, D.S., SCHNEIDER, C.I.M., et al. Alpha-Tocopherol protects against pentylenetetrazol- and methylmalonate-induced convulsions. **Epilepsy Reserch**, v. 66, p. 185-194, 2005.
- RICE-EVANS, C, BURDON, R. Free radical-lipid interactions and their pathological consequences. **Progress in Lipids Research**, v. 32, p.71-110, 1993.
- RIOBO, N.A., MELANI, M., SANJUAN, N. et al. The modulation of mitochondrial nitric oxide syntase activity in rat brain development. **The Journal of Biological Chemistry**, v.277, p. 42.447-42.455, 2002.
- ROSE M.A., VALDES R. Understanding the sodium pump and relevance to disease. **Clinical Chemistry**, v. 40, p. 1674-1685, 1994.

- ROTHMAN, S. M. Excitotoxins: possible mechanism of action. **Annals of The New York Academy of Sciences**, v. 648, p. 132-139, 1992.
- ROTHSTEIN, J.D.; JIN, L.; DYKES-HOBERG, M. et al. Chronic inhibition of glutamate uptake produces a model of slow neurotoxicity. **Proceedings of The National Academy of Sciences USA**, v. 90, p. 6591-6595, 1993.
- ROYES, L.F.F., FIGHERA, M.R., FURIAN, A. F., et al. Creatine protects against the convulsive behavior and lactate production elicited by the intrastriatal injection of methylmalonate. **Neuroscience**, v.118, p. 1079-1090, 2003.
- ROYES, L.F.F., FIGHERA, M.R., FURIAN, A.F., et al. Involvement of NO in the convulsive behavior and oxidative damage induced by the intrastriatal injection of methylmalonate. **Neuroscience Letters**, v. 376, p.116-120, 2005.
- SAMPATH, D.. JACKSON, G. R., WERRBACH-PEREZ, K. et al. Effects of nerve growth factor on glutathione peroxidase and catalase in PC12 cells. **Journal of Neurochemistry**, v. 62, p. 2476-2479, 1994.
- SANKAR, R.; SHIN, D.H.; WASTERLAIN, C.G. GABA: Metabolism during status epilepticus in the developing rat brain. **Developmental Brain Research**, v. 98, p. 60-64, 1997.
- SAQR, H. E., PEARL, D. K., YATES, A. J. A Review and predictive models of ganglioside uptake by biological membranes. **Journal of Neurochemistry**, v. 61, p. 395-411, 1993.
- SCHAPIRA, A.H. Primary and secondary defects of the mitochondrial respiratory chain. **Journal of Inherited Metabolism Disease**, v.25, p.207-214, 2002.
- SCHNEIDER, J. S. & YUWILLER, A. GM₁ ganglioside treatment promotes recovery of striatal dopamine concentrations in the mouse model of MPTP induced parkinsonism. **Experimental Neurology**, v. 105, p. 177-183, 1989.
- SCHNEIDER, J. S. 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**, v. 31, n° 2, p. 185-192, 1992.
- SCHNEIDER, J. S. & DiSTEFANO, L. Enhanced restoration of striatal dopamine concentrations by combined GM₁ ganglioside and neurotrophic factor treatments. **Brain Research**, v. 674, n° 2, p. 260-264, 1995.
- SCHNEIDER, J. S.; SMITH, M. G.; DI STEPHANO, L. et al. GM₁ ganglioside treatment partially reverses the nigrostriatal dopamine defect in the weaver mutant mouse. **Brain Research**, v. 636, p. 353-356, 1994.
- SHAHEEN, A.A., ABD EL-FATTAH, A.A., GAD, M. Effect of various stressors on the level of lipid peroxide, antioxidants and Na⁺-K⁺-ATPase activity in rat brain. **Experientia**, v. 52, p. 336-339, 1996.
- SKAPER, S. D.; FACCI, L.; LEON, A. Gangliosides attenuate the delayed neurotoxicity of aspartic acid in vitro. **Neuroscience Letters**, v. 117, p. 154-159, 1990.
- SMITH J.R., GHEORGHIADE M., GOLDSTEIN S. The current role of digoxin in the treatment of heart failure. *Coronary Artery Dis*, v. 4, p. 16-26, 1993.
- SNYDER, S. H. & BREDT, D. S. Biological roles of nitric oxide. **Scientific American**, p. 28-35, 1992.
- SNYDER, S. H. & SABATINI, D. M. Immunophilins and the nervous system. **Nature Medicine**, v. 1, p. 32-37, 1995.
- SONNINO, S.; GHIDONI, R.; MARCHESINI, S. et al. Cytosolic gangliosides: occurrence in calf brain as ganglioside-protein complexes. **Journal of Neurochemistry**, v. 33, p. 117-121, 1979.
- SOUSA, S.C., MACIEL, E.N., VERCESI, A.E., CASTILHO, R.F. Ca²⁺-induced oxidative stress in brain mitochondria treated with the respiratory chain inhibitor rotenone. *FEBS Letters*, v. 543, p. 179-183, 2003.

- SOUTHORN, P. A. & POWIS, G. Free radicals in medicine I. Nature and biologic reactins. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 63, p. 381-389, 1988.
- STEIN, D.G. & SABEL B.A. eds. Ganglioside involvement in membrane-mediated transfer of trophic information: relationship to GM1 effects following CNS injury. In: **Pharmacological Approaches to the Treatment of Brain and Spinal Cord Injury**, New York, Plenum, 1988, p. 143-165.
- STOKKE O, GOODMAN SI, MOE PG. Inhibition of brain glutamate decarboxylase by glutarate, glutaconate and β -hydroxyglutarate: explanation of symptoms in glutaric acidurias? **Clinica Chimica Acta**, v. 16, p. 411-515, 1976.
- SVENNERHOLM, L. Isolation of gangliosides. **Acta Chemica Scandinavica**, v. 17, p. 239-250, 1963.
- SVENNERHOLM, L. Gangliosides and synaptic transmission. **Advances Experimental Medicine and Biology**, v. 125, p. 533-544, 1980.
- SVENNERHOLM, L. et al. eds. 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, 1994, p. 337-355.
- SUDAH, K., RAO, A.V., RAO, A. Oxidative stress and antioxidants in epilepsy. **Clinica Chimica Acta**, v. 303, p. 19-24, 2004.
- TAJIRINE, D., GAROFALO, L., CUELLO, A. C. Responses of cortical noradrenergic and somatostinergetic fibers and terminals to adjacent strokes and subsequent treatment with NGF and/or the ganglioside GM1. **Journal Neuroscience Research**, v. 50, p. 627-642, 1997.
- TETTAMANTI, G. & RIBONI, L. Gangliosides and modulation of the function of neural cells. **Advances in Lipid Research**, v. 25, p. 253-267, 1993.

- TOFFANO, G.; SAVOINI, G.; MORONI, F. et al. GM1 ganglioside stimulates the regeneration of dopaminergic neurons in the central nervous system. **Brain Research**, v. 261, p. 163-166, 1983.
- TWOMEY, E.L., NAUGHTEN, E.R., DONOGHUE, V. B., RYAN, S. Neuroimaging findings in glutaric aciduria type 1. **Pediatric Radiology**, v.33, p.823–830, 2003.
- TYLER, D. D. Polarographic assay and intracellular distribution of superoxide dismutase in rat liver. **Journal of Biochemistry**, v. 147, p. 493-504, 1975.
- ULLRICH K, FLOTT-RAHMEL B, SCHLUFF P, et al. Glutaric aciduria type I: pathomechanisms of neurodegeneration. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 22, p.392–403, 1999.
- UMEMURA, A.; MABE, H. ; NAGAI, H. A phospholipase C inhibitor ameliorates postischemic neuronal damage in rats. **Stroke**, v. 23, p. 1163-1166, 1992.
- VANIER, M. T.; HOLM, M.; ÖHMAN, R. et al. Developmental profiles of gangliosides in human and rat brain. **Journal of Neurochemistry**, v. 18, p. 581-592, 1971.
- VITAL, M. A. B. F., FRUSSA-FILHO, R.; PALERMO-NETO, J. Gangliosídeos: perspectivas terapêuticas. **Folha Médica**, v. 110, nº. 2, p. 279-282, 1995.
- VITAL, M.A.B.F, FRUSSA-FILHO, R., PALERMO-NETO, J. Effects of monosialoganglioside on a new animal model of tardive dyskinesia. **Progress Neuro-Psychopharmacology Biology and Psychiatric**, v.21, p. 1169-1179, 1997.
- WAJNER, M.; DUTRA, J. C.; CARDOSO, S. E. et al. Effect of methylmalonate on in vitro lactate release and carbon dioxide production by brain of suckling rats. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 15, p. 92-96, 1992.
- WAJNER, M. & COELHO, J. C. Neurological dysfunction in methylmalonic acidemia is probably related to the inhibitory effect of methylmalonate on brain energy production.

- Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 20, p. 761-768, 1997.
- WAJNER, M., BARSCHAK, A.G., LUFT, A.P., et al. Organic aciduria: diagnosis in high-risk Brazilian patients. **Journal of Pediatrics**, v. 77, p.401-406, 2001.
- WAJNER, M., LATINI, A., WYSE, A.T., DUTRA-FILHO, C.S. The role of oxidative damage in the neuropathology of organic acidurias: insights from animal studies. **Journal Inherited Metabolic Disease**, v.27, p.427-448, 2004.
- WEIHMULLER, F. B.; HADJICONSTANTINO, M.; BRUNO, J. P. et al. Administration of GM1 ganglioside eliminates neuroleptic-induced sensorimotor deficits in MPTP-treated mice. **Neuroscience Letters**, v. 92 , p. 207-212, 1988.
- WELLS, J.M., VENTURA, R.F., EISENHAUER, P.B., et al. Transport of GM1 and GM1 inner ester across an in vitro model of the blood-brain barrier. **Neuroscience Letters**, v.21, p. 121-124, 1996.
- WENDEL, A. Glutathione Peroxidase. **Methods in Enzymology**, v. 77, p. 325-332, 1981.
- WERNIS, S. W. & LUCHESE, B. R. Free radicals and ischemic tissue injury. **TIPS**, v. 11, p. 161-166, 1990.
- WHETSELL WO JR, SCHWARCZ R. The organotypic tissue culture model of corticostriatal system used for examining amino acid neurotoxicity and its antagonism: studies on kainic acid, quinolinic acid and (-) 2-amino-7-phosphonoheptanoic acid. **Journal Neural Transmission Supplementum**, v.19, p.53-63, 1983.
- WIEGANDT, H. Gangliosides. In: Neuberger, A. Van Deenen, L.L.M. eds., **Glycolipids, New Comprehensive Biochemistry**, p.199-260. Elsevier, Amsterdam, 1985.
- WITTING, L. A. & HORWITT, M. K. Effect of degree of fatty acid unsaturation in tocopherol deficiency-induced creatinuria. **Journal of Nutrition**, v. 82, p. 19-23, 1964.
- WOJCIK, M.; ULAS, J.; ODERFELD-NOWAK, B. The stimulating effect of ganglioside injections on the recovery of choline acetyltransferase and acetylcholinesterase activities in the hippocampus of the rat after septal lesions. **Neuroscience**, v. 7, p. 495-499, 1982.

- WYSE, A.T.S.; STRECK, E.L.; BARROS, S.V.T.; BRUSQUE, A.M.; ZUGNO, A.I.; WAJNER, M. Methylmalonate administration decreases Na⁺, K⁺-ATPase activity in cerebral cortex of rats. **NeuroReport**, v. 11, p. 2331-2334, 2000.
- WYSE AT, ZUGNO AI, STRECK EL, et al. Inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase activity in hippocampus of rats subjected to acute administration of homocysteine is prevented by vitamins E and C treatment. **Neurochemistry Research**, v. 27, p.1685-1689, 2002.
- YAMAMOTO, F., TANAKA, E., SHOJI, Y. et al. Factors that reverse the persistent depolarization produced by deprivation of oxygen and glucose in rat hippocampal CA1 neurons in vitro. **Journal Neurophysiology**, v. 78, p. 903-911, 1997.
- YU, R.K. & SAITO, M. Structure localization of brain gangliosides. In: Margolis, R.U.; Margolis, R.K. (eds.), **Neurobiology of Glycoconjugates**, pp 1-41. Plenum, New York, 1989.
- ZEEVALK GD, NICKLAS WJ .Evidence that the loss of the voltage-dependent Mg²⁺ block at the N-methyl-D-aspartate receptor underlies receptor activation during inhibition of neuronal metabolism. **Journal of Neurochemistry**, v.59, p.1211-1220, 1992.
- ZEEVALK GD, BERNARD LP, SINHA C, et al.. Excitotoxicity and oxidative stress during inhibition of energy metabolism. **Development of Neuroscience**, v.20, p. 444-453, 1998.
- ZHANG, J.& PIANTADOSI, C. A. Prevention of H₂O₂ generation by MAO protects against CNS O₂ toxicity. **Journal of Applied Physiology**, v. 71, p. 1057-1061, 1991.
- ZOLI, M.; RUGGERI, M.; ZINI, I. et al. Aspects of neuronal plasticity in the central nervous system-VI. Studies of the effects of gangliosides on brain metabolic lesions. **Neurochemistry International**, v. 16 , n° 4, p. 469-478, 1990.