UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE PSICOLOGIA

DANILO ARAUJO AMARAL SANTOS

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO GANGLIOSÍDEO GM1 POR VIA INTRAESTRIATAL
EM MODELO ANIMAL DE DOENÇA DE PARKINSON INDUZIDA POR 6-HIDROXI-
DOPAMINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Neurociências e Comportamento do Instituto de Psicologia da
Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestrado.

São Paulo

2018

DANILO ARAUJO AMARAL SANTOS

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO GANGLIOSÍDEO GM1 POR VIA INTRAESTRIATAL
EM MODELO ANIMAL DE DOENÇA DE PARKINSON INDUZIDA POR 6-HIDROXI-
DOPAMINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Neurociências e Comportamento do Instituto de Psicologia da
Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestrado.

Área de Concentração: Neurociências e Comportamento

Orientador: Prof. Dr. Luiz Roberto G. Britto

São Paulo

2018

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação aos meus filhos, Davi e Beatriz por me darem combustível diário para todas minhas realizações. E dedico principalmente à minha esposa Bruna Aparecida Gonsales Santos, meu amor, minha amiga, minha parceira. Obrigado por sempre estar ao meu lado. Te amo demais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Luiz Roberto G. de Britto pela paciência de todos esses anos, ensinamentos e por ser um exemplo de Chefe. Sou eternamente grato pela abertura dessa porta da ciência.

Ao Pedro Oliveira “Pedrão”, meu amigo, meu mentor, meu professor. Que honra poder ter discutido tantos assuntos com você meu amigo! Inclusive sobre esse trabalho. Você é fantástico. Obrigado!

A todos os alunos que passaram e alguns que permanecem no laboratório do Professor Britto que me ajudaram, ensinaram, aconselharam e se tornaram meus amigos (André, Ana, Cecília, Priscila, Thiago, Roberto, Kallene, Marina, Rosana, Jáfia, Katherine, Vivian, Mauro, Deborah, Erika, Elisa, Monique, Carol Parga, Anry). Não posso deixar de destacar uma pessoa em especial, que me ensinou todas as técnicas que hoje eu sei, que até hoje me atende e tem a paciência de me explicar e ensinar, obrigado Carol Real.

Ao Adilson “Di”, que sempre esteve presente e sempre disposto a ajudar! O melhor cafezinho de todos esses anos.

Aos meus pais Fernando Amaral Santos e Nelma Marta Araujo Santos que sempre, sempre, sempre esteve ao meu lado. Acreditaram em mim mesmo quando falhei, acreditaram em mim mesmo quando errei. Amo vocês, obrigado por tudo, sem vocês eu não seria absolutamente nada.

As minhas lindas irmãs Fernanda e Carol, simplesmente por me amar e saber que sempre posso contar com elas para qualquer coisa. Amo vocês meninas.

Ao meu finado sogro Vanderley e minha sogrona Dona Dilza. Ajudaram-me demais.
Ao meu amigo Edilson, participou ativamente dessa minha conquista.

Aos meus avôs que não estão mais nesse plano Adalgiso e José Célio e minha vó Zoca, e a minha vizinha Edite que está vivíssima, por serem o alicerce familiar.

A toda minha FAMILIA e AMIGOS, cada um importante de uma maneira.

E principalmente a Deus, que me proporcionou saúde e força para mais uma realização.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE PSICOLOGIA

Candidato (a): Danilo Araujo Amaral Santos

Titulo da Tese: “ AVALIAÇÃO DO EFEITO DO GANGLIOSÍDEO GM1 POR VIA
INTRAESTRIATAL EM MODELO ANIMAL DE DOENÇA DE PARKINSON
INDUZIDA POR 6-HIDROXI-DOPAMINA”

Orientador: (a): Prof. Dr. Luiz Roberto G. de Britto

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, em
sessão pública realizada em/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Banca Examinadora:

.....
(Nome e Assinatura)

.....
(Nome e Assinatura)

.....
(Nome e Assinatura)

.....
(Nome e Assinatura)

RESUMO

Várias evidências têm caracterizado os efeitos benéficos do gangliosídeo GM1 no tratamento de lesões neurológicas. O GM1 também foi estudado para o tratamento de doenças neurodegenerativas, principalmente em relação ao seu papel na neuroplasticidade e neuroproteção. O objetivo deste estudo foi analisar os possíveis efeitos de GM1 em modelo de doença de Parkinson induzida pela injeção intraestriatal unilateral de 6-hidroxidopamina (6-OHDA) em ratos. O GM1 foi injetado em conjunto com 6-OHDA e sete dias após a cirurgia os cérebros foram coletados para análise. Os resultados bioquímicos mostraram que o tratamento com GM1 intraestriatal atenua aspectos inflamatórios e reduz os indicadores de morte neuronal, tal como evidenciado pela manutenção dos níveis de GFAP, OX-42 e caspase-3 em níveis de controle. A melhoria no tratamento por GM1 foi também demonstrada com a preservação de um fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) e os níveis de tirosina hidroxilase após 6-OHDA. A análise comportamental corrobora os achados bioquímicos, demonstrando que o GM1 possui a capacidade de preservação dos movimentos, visto pelo teste de cilindro. Sugerimos que o GM1 exerce neuroproteção no modelo de 6-OHDA, quando administrado por uma via local. Isto poderia representar um meio viável para transpor as barreiras farmacocinéticas que afetam a entrega de uma concentração apropriada da droga para áreas do cérebro.

Palavras-chaves: gangliosídeo GM1, 6-OHDA, neuroplasticidade, neuroproteção.

ABSTRACT

Several evidences have characterized the beneficial effects of ganglioside GM1 in the treatment of neurological lesions. GM1 has also been studied for the treatment of neurodegenerative diseases, mainly in relation to its role in neuroplasticity and neuroprotection. The objective of this study was to analyze the possible effects of GM1 on a model of Parkinson's disease induced by unilateral intra-striatal injection of 6-hydroxydopamine (6-OHDA) in rats. The GM1 was injected together with 6-OHDA and seven days after surgery the brains were collected for analysis. Biochemical results showed that treatment with intra-striatal GM1 attenuates inflammatory aspects and reduces the indicators of neuronal death, as evidenced by maintaining levels of GFAP, OX-42 and caspase-3 at control levels. Improvement after GM1 treatment was also demonstrated by the preservation of a brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and tyrosine hydroxylase levels after 6-OHDA. The behavioral analysis corroborates the biochemical findings, demonstrating that GM1 has the ability to preserve movements, as seen by the cylinder test. We suggest that GM1 exerts neuroprotection in the 6-OHDA model when administered by a local route. This could represent a viable means of overcoming the pharmacokinetic barriers affecting the delivery of an appropriate concentration of the drug to areas of the brain.

Key words: ganglioside GM1, 6-OHDA, neuroplasticity, neuroprotection.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1	Representação da estrutura química do monossialogangliosídeo (GM1)	09
FIGURA 2	Representação da atuação do GM1 aumentando a atividade do receptor Ret tirosina quinase	12
FIGURA 3	Análise da concentração em função de tempo da radioatividade volátil e não-volátil do GM1 no sangue de camundongos após única injeção	17
FIGURA 4	Representação da morte neuronal da DP	19
FIGURA 5	Representação de como a 6-OHDA e MPTP atuam como modelos de Doença de Parkinson	21
FIGURA 6	(A e C) Ilustração do Estriado e SN da imunomarcção para TH	31
	(B e D) Gráfico da imunomarcção relativa para TH.....	31
FIGURA 7	(A e C) Ilustração do Estriado e SN da imunomarcção para GFAP.....	32
	(B e D) Gráfico da imunomarcção relativa para GFAP.....	32
FIGURA 8	(A e C) Ilustração do Estriado e SN da imunomarcção para OX-42.....	33
	(B e D) Gráfico da imunomarcção relativa para OX-42.....	33
FIGURA 9	(A e C) Ilustração do Estriado e SN da Imunofluorescência para BDNF.....	34
	(B e D) Gráfico da Imunofluorescência para BDNF.....	34
FIGURA 10	(A e B) Gráfico dos níveis relativos de proteínas de TH.....	35
FIGURA 11	(A e B) Gráfico dos níveis relativos de proteínas de Caspase-3.....	36
FIGURA 12	(A e B) Gráfico dos níveis relativos de proteínas de GFAP.....	37
FIGURA 13	Teste de cilindro 7º dia após cirurgia.....	39
FIGURA 14	Teste de cilindro 15º dias após cirurgia.....	40

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	7
2. JUSTIFICATIVA.....	22
3. OBJETIVOS.....	23
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
5. RESULTADOS.....	30
6. DISCUSSÃO.....	40
7. CONCLUSÃO.....	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46

1 Introdução

O sistema nervoso é uma rede de comunicação que controla e permite que o organismo se comunique apropriadamente com o ambiente. No entanto, qualquer processo patológico que cause morte neuronal, como, por exemplo, a Doença de Parkinson (DP) e a Doença de Alzheimer, interfere nessa comunicação, acarretando danos muitas vezes irreversíveis (GOODWIN et al., 2008).

O processo de envelhecimento é um fenômeno biológico normal na vida de todos os seres vivos e não deve ser considerado doença. Apesar desse fato, deve-se considerar que o sistema nervoso é o sistema biológico mais comprometido com o processo de envelhecimento, pois é o responsável pelo processamento de informações que visam manter a interação do indivíduo com o ambiente (ELLISON et al., 2004).

As doenças neurodegenerativas estando em evidência devido ao crescimento da população idosa, diversos estudos buscam avanços para tratamento farmacológico, e consequente melhoria na qualidade de vida desses pacientes. Nesse contexto o foco desse trabalho busca avaliar o uso do GM1 (monossialotetrahexosilgangliosídeo) na DP.

1.1 Gangliosídeos

1.1.1 Histórico

Os primeiros gangliosídeos foram identificados por Ernest Klenk na década de 30. Em meados dos anos 50 e 60 associou-os à matéria cinzenta do tecido cerebral também conhecidas por Gangliozellen, e assim os nomeou de gangliosídeos

(KLENK, 1935). Diversos estudos demonstraram sua distribuição celular, principalmente em células neurais (neurônios e glia), indicando sua importância na fisiologia celular. Especificamente sua alta concentração em neurônios tanto em desenvolvimento quanto em neurônios adultos (pouco mais de 10% do conteúdo lipídico total) sugere uma função crítica dos gangliosídeos no sistema nervoso (LEEDEN, 1978; SVENNERHOLM, 1956).

No fim dos anos 70 os estudos caminharam no sentido de demonstrar de fato o potencial terapêutico dos gangliosídeos; Cecarelli et al., 1976 por exemplo, sugere como o gangliosídeo afeta o processo de regeneração em danos neuronais. Em 1977 Obata et al verificou que o gangliosídeo possui a capacidade de potencializar a dentritogênese e sinaptogênese. Nos anos 80, especificamente com o gangliosídeo GM1, iniciaram-se estudos do seu efeito sobre a dopamina (DA) verificando sua capacidade terapêutica e envolvimento com a via nigroestriatal (AGNATI et al, 1983; TOFFANO et al, 1984; HADJICONSTANTINO et al, 1986). Com estudos demonstrando de fato a efetividade terapêutica do GM1 em patologias neurológicas, os estudos direcionaram-se a serem mais específicos na lesão cerebral isquêmica, lesão traumática cerebral e Doença de Parkinson (DP) (SCARPINO et al, 1991; SCHNEIDER et al, 1992; LIBERINI et al, 1993; SCHNEIDER, 1994).

1.1.2 Química e nomenclatura

Os gangliosídeos são classificados como glicoesfingolipídios acídicos por conter em sua estrutura molecular ácido siálico ligado a uma estrutura de oligoglicosil juntamente com uma base ceramida (KOLTER et al., 2002; LEDEEN R.W & WU G, 2015). O número de resíduos de ácido siálico por molécula de

gangliosídeo varia de 1 a 7, tendo como o ácido siálico mais abundante no gangliosídeo cerebral o N-acetil-neuramínico e o N-glicolil-neuramínico (YU & SAITO, 1992). O gangliosídeo GM1, que será estudado aqui, é um dos principais glicoesfingolípídeos do tecido nervoso de mamíferos. É uma molécula anfótera, cuja porção lipofílica contém esfingosina e a porção hidrofílica contém oligossacarídeo. O GM1 possui um resíduo de ácido siálico e quatro açúcares neutros (podem ser: glicose, galactose, N-acetilglicosamina, N-acetilgalactosamina, fucose), possuindo esses resíduos unidos a oligossacarídeos neutros por ligações α -glicosídicas (FIGURA 1) (SVENNERHOLM, 1956; TETTAMANTI & RIBONI, 1993; LEDEEN & WU, 2015).

A classificação dos gangliosídeos varia de acordo com a sequência de oligossacarídeos ligados a base de ceramida, sendo divididos em séries: hemato, gânglio, lacto, globo, gala, neolacto, isoglobo (TETTAMANTI & RIBONI, 1993).

Svennerholm (1963) classificou os gangliosídeos da seguinte forma: letra G seguida de M (monossialo-), D (dissialo-), T (trissialo-), Q (tetrassialo-), P (pentassialo-) de acordo com o número de resíduos de ácido siálico (1 a 7), seguido de um número. Quando necessário, coloca-se “a” ou “b” que indica a configuração do isômero.

FIGURA 1: Representação da estrutura química do monossialogangliosídeo (GM1). Possui ligados a base de ceramida um resíduo de ácido siálico e quatro açúcares neutros.
FONTE: MAHADIK & KARPIAK, 1988.

1.1.3 Localização e Função

Os gangliosídeos estão presentes principalmente assimetricamente na parte externa das membranas plasmáticas dos tecidos vertebrados, onde a porção oligossacarídica fica exposta na superfície extracelular e a porção ceramida inserida na membrana (HAKAMORI, 1981). Na superfície extracelular, os gangliosídeos estão envolvidos no reconhecimento de células e na transdução de sinal e adesão dentro de micro domínios de superfície celular específicos, denominados caveola (balsas lipídicas) ou micro domínios enriquecidos em glicoesfingolipídeos, com outros componentes da membrana como esfingomielinina e colesterol (ANDERSON, 1998; SIMONS & TOOMRE, 2000).

Os gangliosídeos estão em maior concentração na região sináptica, apesar de estar presente em toda superfície neuronal. Após serem sintetizados no corpo celular, são transferidos para locais apropriados pelo sistema de transporte axonal (YU & SAITO, 1989; HAKOMORI et al, 1998). É importante ressaltar que existem diversos tipos de gangliosídeos, que diferem basicamente pelas diferentes combinações de resíduos de açúcar anexados à base de ceramida, além da quantidade de resíduos de ácido siálico, que também serve para diferenciar o tipo de Gangliosídeo (SVENNERHOLM, 1994).

Sugere-se que os gangliosídeos exerçam sua função atuando como receptores e assim interagindo com outras células, bem como a matriz extracelular e com substâncias exógenas devido a sua morfologia como descrito acima, e atuando como modulador de proteínas funcionais de membrana, por exemplo, receptores de fatores tróficos e transportadores (HAKOMORI et al, 1990, LEDEEN R.W & WU G, 2008;2015).

Os gangliosídeos também demonstraram estar presentes em membranas nucleares, assim sendo, foi proposto que os gangliosídeos também desempenham papéis importantes na modulação da homeostase de cálcio intracelular e intranuclear (LEDEEN & WU, 2008). Existe um aumento de influxo de íons cálcio em sinaptosomas, mediados pelos gangliosídeos GM1 e GQ1b, indicando uma modulação nos processos eletroquímicos de transmissão, com consequente armazenamento de informações no sistema nervoso (RAHMANN, 1995).

As ações endógenas dos gangliosídeos sugeridas basicamente são: participação no processo de crescimento, reconhecimento e diferenciação celular, além de serem necessárias funcionalmente para processos de neuritogênese e sinaptogênese (ERIN N.N et al, 2014).

As ações exógenas dos gangliosídeos, porém mais especificamente do gangliosídeo GM1 são: aumento da sobrevivência neuronal, crescimento neurítico e dos contatos sinápticos (CUELLO, et al 1986; DOHERTY, et al 1985), redução do desequilíbrio enzimático, iônico e celular causado por modelo experimental de lesão cerebral isquêmica (REIVICH M, et al 1984). Resumidamente, o gangliosídeo GM1 apresenta ações neurotróficas e neuritogênicas in vitro e in vivo

e promove crescimento, sobrevivência, expressão fenotípica e restauração funcional de múltiplas populações neuronais, incluindo fenômenos colinérgicos, dopaminérgicos, serotoninérgicos e noradrenérgicos (HADJICONSTANTINOU & NEFF 1998, 2000).

Essas propriedades destacadas acima estão relacionadas ao aumento da atividade do receptor de RET (tirosina quinase de transmembrana que participa num complexo de proteína de superfície celular que se liga às neurotrofinas da família do fator neurotrófico derivado glial (GDNF)) para o GDNF in situ e in vivo e

que este possa ser um mecanismo para as ações neurotróficas de GM1 em neurônios dopaminérgicos (FIGURA 2) (ERIN N.N et al, 2014).

FIGURA 2: Representação da atuação do GM1 aumentando a atividade do receptor Ret tirosina quinase para o fator neurotrófico derivado de células da glia (GDNF) no estriado in situ e in vivo. A) Condição Basal B) GM1 estimulando receptor.

Diversas teorias da bioatividade do GM1 foram sugeridas, porém ainda não existe uma compreensão completa do (s) mecanismo (s). A visão predominante é que o GM1 interage com a sinalização neurotrófica, pois existem evidências convincentes de que a GM1 modula a ativação e a fosforilação dos receptores de quinases de Trk para neurotrofinas no cérebro, iniciando a transdução de sinal que resulta na ativação das quinases ERK1 e ERK2 (DUCHEMIN et al, 2008).

O gangliosídeo GM1 é extraído por hidrólise seletiva, partindo-se de glicoesfingolípídeos cerebrais. Inicialmente o GM1 foi extraído de cérebro bovino e posteriormente purificado para uso em humanos, porém existiu a preocupação de contaminação por príons que causam encefalopatia espongiforme bovina, que foi evitada com a extração do GM1 do cérebro de porco (DI MARTINO et al., 1993).

Sua biossíntese ocorre inicialmente por uma modificação da serina, acompanhada por adição de vários grupos de açúcar, seguida sempre de adição de no mínimo um grupo siálico; já a síntese da ceramida sugere-se que aconteça no retículo endoplasmático (KOLTER et al., 2002).

O gangliosídeo GM1 exógeno é um gangliosídeo semi-sintético no qual seu mecanismo de ação ainda requer mais estudos para seu melhor entendimento, porém existem teorias sobre seu efeito no cálcio intracelular, ativação de enzimas intracelulares, modulação de receptores e também sobre a interação com fatores neurotróficos (HYDEYOSHI & NAI HONG, 2003). Sabe-se que o GM1 exógeno se incorpora às membranas neuronais e acarreta em alterações funcionais. Após a incorporação, o GM1 fica estável pelo menos por 24 horas, já sendo demonstrada tanto in vitro quanto in vivo (AGNATI et al., 1985).

As ações neuroprotetoras do GM1 exógeno vêm sendo estudadas em diversos modelos experimentais. Em modelo de culturas de neurônios, foi verificado o aumento da sobrevivência neuronal, crescimento neurítico, além do aumento sináptico (CUELLO et al., 1986; DOHERTY et al., 1985; SKAPER et al., 1985). Em modelo de lesão cerebral isquêmica (KARPIAK et al., 1987; REIVICH et al., 1984) o GM1 exógeno reduziu o desequilíbrio enzimático, iônico e celular e também reduziu a neurotoxicidade na zona de penumbra pós lesão, além de ter aumentado o fluxo sanguíneo na mesma. Em modelo de lesão traumática cerebral, houve recuperação da atividade enzimática, melhora morfológica, e melhora no comportamento, que estavam alterados a pós a lesão (CASAMENTI, F., et al.1985).

Alguns autores têm identificado resultados promissores em relação aos benefícios proporcionados pelo GM1 administrado por via intraperitoneal, verificando ações neuroprotetoras e neuroplásticas por mecanismos ainda sendo estudados

(TOFFANO, et al., 1984; KOJIMA, et al., 1984; AGNATI, et al. 1985; JONSSON, 1985; FADDA, et al., 1993; SAUTTER, et al., 2000). Em estudo realizado por XIAO-HONG BA em 2014 foi verificado também que o GM1 atenua fatores relacionados à inflamação característicos da DP, melhorando assim aspectos comportamentais, visto por rotação de apomorfina, além da melhora de aspectos biológicos.

No mesmo sentido, SCHNEIDER et al., 2010 e 2013 investigou a confirmação desses benefícios em estudos clínicos envolvendo seres humanos com DP. Em um de seus estudos (SCHNEIDER et al. 2010), considerando resultados preliminares favoráveis em relação à diminuição de sintomas da DP em pacientes estudados por 16 semanas, os autores objetivaram avaliar a segurança e eficácia do uso da droga por tempo prolongado. Tratou-se de um estudo aberto que envolveu 26 pacientes, acompanhados por um período de 5 anos. Foram administradas doses de 200 mg/dia (via subcutânea – s.c.). Após esse período, os pacientes geralmente apresentaram resultados motores inferiores na Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS) do que aqueles constatados na linha de base anterior à randomização no estudo. O estudo concluiu que o uso prolongado de GM1 em pacientes com DP é seguro e pode proporcionar algum benefício clínico. Contudo, estudos adicionais seriam necessários para avaliar o grau de benefício sintomático e/ou modificador da doença que o tratamento com GM1 poderia proporcionar.

Em outro estudo, SCHNEIDER et al (2013) objetivaram investigar possíveis efeitos sintomáticos ou modificadores da Doença de Parkinson. Foram envolvidos 77 pacientes com PD, randomizados em dois grupos. Um deles recebeu GM1 por 120 semanas e o outro recebeu placebo por 24 semanas, seguido por 96 semanas com administração diária de GM1. O sistema posológico empregou dose de ataque de

1.000 mg administrados por via intravenosa e manutenção do tratamento com doses de 200 mg s.c.

O desfecho primário envolveu alterações na linha de base de escala motora da UPDRS. Depois de 24 semanas, o grupo que recebeu GM1 desde o início do estudo apresentou significativa melhora no UPDRS, enquanto piores resultados foram apresentados pelo outro grupo. O estudo proporcionou evidências de que o uso de GM1 por 24 semanas foi superior ao placebo para melhora dos sintomas motores e que o uso estendido de GM1 (120 semanas) culminou em uma velocidade de progressão dos sintomas menor do que o esperado. Desse modo, segundo os autores, os dados desse estudo sugerem que GM1 apresenta efeitos sintomáticos e potencialmente modificadores da doença sobre a DP.

Apesar dos benefícios terapêuticos constatados serem estatisticamente significantes, são modestos em magnitude. GUSHENG, et al. (2011 e 2012) sugerem que a reduzida capacidade do GM1 em transpor a barreira hematoencefálica a partir de sua administração periférica pode constituir a principal limitação a seus benefícios terapêuticos no tratamento da DP. Sendo assim, torna-se interessante a investigação dos efeitos proporcionados pelo GM1 a partir de sua administração central (intraestriatal e intratecal) como uma nova via de utilização desse fármaco.

1.1.4 Toxicologia e excreção

O gangliosídeo GM1 não demonstrou efeitos tóxicos nos estudos de toxicidade subaguda, crônica e teratogênese em várias espécies animais, ficando comprovado que o GM1 é isento de atividade sobre a fertilidade, nos períodos peri e

pós-natal, de efeito anafilatogênico e de poder mutagênico. O GM1 exógeno como já citado, incorpora-se de maneira estável na membrana celular, sendo encontrado também, como molécula íntegra na membrana das células do sistema nervoso, acarretando em alterações funcionais (TETTAMANTI, et al 1981). Depois de incorporado à membrana neuronal, o GM1 é estável por pelo menos 24 horas e a via principal de eliminação de seus metabólitos é a urina. A presença de lesões cerebrais em animais não influenciou a farmacocinética do GM1 (AGNATI, et al 1985).

Foram investigados os níveis sanguíneos do GM1 exógeno (marcados, e avaliados por radioatividade) metabolizado e não-metabolizado após 1 injeção aplicada em diferentes vias de administração. Por via intravenosa e intramuscular as curvas dos níveis sanguíneos do GM1 não metabolizado apresentaram pico aproximadamente em 1 hora, enquanto por via subcutânea esse nível não metabolizado alcançou seu pico em aproximadamente 4 horas. Por via intravenosa houve uma queda brusca desse nível de GM1 não metabolizado, tornando-se bifásico em aproximadamente 7 horas. Por via intramuscular e via subcutânea torna-se bifásica e reduzindo-se somente a metade de GM1 metabolizado em aproximadamente 10 horas (FIGURA 3) (TETTAMANTI, et al 1981).

FIGURA 3: Análise da concentração em função de tempo da radioatividade volátil e não-volátil do GM1 no sangue de camundongos após única injeção
Fonte: TETTAMANTI, *et al* 1981.

Diferentemente da estabilidade do GM1 no cérebro, onde existem relatos que o GM1 exógeno possui a capacidade de, após 40 horas de uma única aplicação, ainda possuir uma concentração no cérebro de 25%, o fígado possui a capacidade de degradar rapidamente o GM1 (TETTAMANTI, G., *et al* 1981).

1.1.5 Doença de Parkinson

A DP, também denominada paralisia agitante ou parkinsonismo idiopático, constitui uma das mais frequentes doenças degenerativas do sistema nervoso (ELLISON *et al.*, 2004). Trata-se de uma patologia neurodegenerativa que afeta o estado físico, psicológico, social e funcional dos indivíduos (GOODWIN *et al.*, 2008), que ocorre principalmente no idoso (SCHAPIRA, 2009). Os primeiros distúrbios

motores presentes na doença de Parkinson foram relatados por James Parkinson, em 1817, em seu trabalho “An essay on the shaking palsy” (BLUM et al., 2001).

Descrita por James Parkinson como a “paralisia agitante”, é caracterizada sintomaticamente por rigidez, tremor durante o repouso (movimentos rotatórios e movimentos repetidos com a cabeça para cima e para baixo), acinesia ou perda da iniciação dos movimentos, face mascarada (perda da expressão) e alteração no tom da fala (BRADLEY, 1991).

A ocorrência da doença na maioria dos casos é de origem idiopática e apenas 5% dos casos têm natureza hereditária. Sua manifestação acomete indivíduos com faixa etária média de 55 anos, afetando cerca de 1% da população com mais de 50 anos. A incidência é muito baixa em indivíduos com menos de 40 anos, mas aumenta para 2% após os 65 anos (HUGHES et al., 1993).

A DP está relacionada com a perda de neurônios na substância negra (SN) em sua porção compacta (SNc), e consequentemente, da concentração de dopamina (DA) na área de projeção destes neurônios no estriado (CALNE, 1994). Segundo Dickson (2003) e Davis e Robertson (1997), essas lesões características incluem as despigmentações da zona compacta da SNc e do locus ceruleus, o que corresponde à perda neuronal (FIGURA 4). A morte neuronal de origem idiopática SNc chega a 5% ao ano (FEARNLEY, 1991).

As alterações bioquímicas identificadas na doença que afetam os núcleos da base e sua origem neuroquímica foram descobertas e na mesma ocasião; foi demonstrado que o conteúdo de DA da SN e do corpo estriado nos cérebros post-mortem dos pacientes com DP era extremamente baixo (menor que 10% do normal), elevando o número de receptores de DA e produzindo um estado de

hipersensibilidade pela desnervação (FIGURA 4) (LOTHARIUS & BRUNDIN, 2002; BRAAK et al., 2006).

A SN possui neurônios impregnados por neuromelanina, atribuindo-lhes uma coloração escura, embora, com sua morte, ocorra despigmentação, deixando a estrutura clara (AGID, 1991). Associada à perda neuronal, nota-se a formação de precipitados proteicos intracitoplasmáticos, constituídos principalmente pelas proteínas sinucleína, parkina e ubiquitina, que são chamados corpúsculos de Lewy (FIGURA 4) (TRETIAKOFF, 1919).

FIGURA 4 - Representação da morte neuronal da DP. A) Representação esquemática da via nigroestriatal normal (B) Representação esquemática da via nigroestriatal de um paciente com DP. FONTE: DAEUR & PRZEDBORSKI (2003).

Segundo Barnham e colaboradores (2004), os aspectos moleculares associados a agregados protéicos intracelulares, os corpos de Lewy, em várias partes do cérebro, consistem principalmente de α -sinucleína (proteína sináptica presente no cérebro em grandes quantidades), cuja função normal está relacionada com a reciclagem de vesículas sinápticas (responsáveis pelo armazenamento de

DA). Isso ocasiona aumento na DA citosólica, cuja degradação produz espécies reativas de oxigênio, causando neurotoxicidade (BOSSY-WETZEL et al., 2004).

É relatado que a resposta inflamatória imune também está fortemente associada à doença degenerativa neural. Em torno de neurônios degenerativos existem muitas microglias e astrócitos ativados que liberam muitas neurotoxinas e fatores inflamatórios, incluindo IL-1 β , IL-6 e TNF- α . Esses fatores inflamatórios estão principalmente presentes no sistema nigrostriatal e desempenham um papel importante na degeneração e morte de neurônios dopaminérgicos (TEISMANN & SCHULZ, 2004). Fatores inflamatórios desencadeiam uma série de caminhos de transdução de sinal relacionados à morte através da liberação de muito óxido nítrico, finalmente levando à degeneração ou morte de neurônios (HUNOT, 1997).

Na procura de avanços do conhecimento sobre a DP muitos modelos experimentais têm sido desenvolvidos para mimetizar em animais as características da DP observada na clínica em humanos. Muitos desses modelos empregam substâncias que propiciam sintomas semelhantes ao parkinsonismo. (MEREDITH et al., 2008), a saber: 1) análogos da DA como a 6-hidroxi-DA (6-OHDA), que está presente no encéfalo de pacientes com DP (JELLINGER et al., 1995); 2) contaminantes da heroína sintética - 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP); 3) herbicidas e pesticidas como a rotenona, paraquat e maneb; e 4) metais como, por exemplo, o manganês (SMEYNE et al., 2005).

Atualmente, a 6-hidroxidopamina (6-OHDA) representa uma das neurotoxinas mais comumente usadas em modelos de degeneração, sendo um análogo hidroxilado do neurotransmissor da DA (BLUM et al., 2001). Foi originalmente isolado por Senoh e Witkop (1959), porém seus efeitos biológicos foram demonstrados pela primeira vez por Porter et al (1963). Hoje, 6-OHDA representa

uma das neurotoxinas mais comumente usadas em modelos de degeneração em projeções centrais catecolaminérgicas, incluindo o sistema nigro-estriatal, in vivo e in vitro (SACHS & JONSSON, 1975; BLUM et al., 2001). A indução da toxicidade por 6-OHDA é relativamente seletiva para os neurônios catecolaminérgicos, resultante de uma incorporação preferencial por moléculas transportadoras de dopamina e noradrenalina (LUTHMAN et al., 1989). Dentro dos neurônios, a 6-OHDA se acumula no citossol e induz a morte celular por indução à formação de radicais livres que medeiam as lesões celulares (FIGURA 5) (JEON et al., 1995).

FIGURA 5 – Representação de como a 6-OHDA e MPTP atuam como modelos que degeneram as projeções catecolaminérgicas, incluindo o sistema nigro-estriatal. FONTE: SCHOBBER., 2004.

2 Justificativa

Diversas terapias medicamentosas para DP vêm sendo aplicadas desde 1867, com ORDENSTEIN relatando pela primeira vez um efeito anti-parkinsoniano com as tinturas beladona (*Atropa belladonna*) que atuava como anticolinérgico, sendo o primeiro tratamento amplamente aceito para o parkinsonismo. Durante quase um século, o uso de anticolinérgicos permaneceu como único tratamento possível para o parkinsonismo (FELDBURG, 1945). No entanto, em 1958, houve a descrição do sistema nigro-estriatal de transmissão dopaminérgica, e desde então o tratamento de primeira escolha para a DP é o precursor ativo da DA a L-dihidroxifenilalanina (OLANOW et al., 1995).

Porém, a L-DOPA possui limitações terapêuticas, como pouco efeito sobre determinados sintomas motores (marcha e disfunção de equilíbrio) e sobre os sintomas não motores (disfunção autonômica, síndromes dolorosas, distúrbios do sono, distúrbios de humor e demência) (SETHI, 2008); além disso, 40% dos pacientes desenvolvem discinesia em 5 anos de tratamento, e em 10 anos esse quadro chega a 90%, sendo o maior fator limitante na progressão da terapia dopaminérgica (AHLISKOG & MUENTER, 2001).

A introdução da L-DOPA revolucionou o tratamento para este distúrbio, mas a utilidade a longo prazo da droga é limitada por complicações motoras citadas acima. As informações sobre a organização dos gânglios basais nas condições normais e PD permitiram o projeto de novas estratégias de tratamento que reduzam o risco de desenvolver complicações motoras. Além disso, o aumento do conhecimento dos mecanismos responsáveis pela morte celular na DP permitiu o desenvolvimento de

drogas neuroprotetoras putativas que podem retardar ou parar a progressão da doença (OLANOW, 2004).

Devido às limitações terapêuticas encontradas nos tratamentos disponíveis para a DP, diversos estudos vêm procurando alternativas para o tratamento e futura melhora na qualidade de vida do paciente. Nesse contexto, os gangliosídeos vêm sendo estudados, devido a suas características neuroprotetoras, além do fato de que baixos níveis de gangliosídeos endógenos induzem dano axonal visto em estudos pós morte (YAMASHIDA et al., 2005). Nenhum medicamento ainda foi estabelecido para alterar a taxa de progressão da doença, mas o ritmo rápido da pesquisa oferece motivo de otimismo.

3 Objetivos

Avaliar os efeitos do GM1 aplicado em única dose Intraestriatal em ratos submetidos ao modelo de Parkinson com 6-OHDA.

3.1 Objetivos específicos

- I) Induzir lesão por 6-OHDA, avaliando a imuno-reatividade para tirosina-hidroxilase na substância negra e no estriado.
- II) Determinar a expressão de BDNF (fator neurotrófico derivado do cérebro), OX42 (CD11 b/c) marcador de microglia, GFAP (proteína ácida glial fibrilar) marcador astrocitário e caspase-3, um marcador de morte celular, na SN e estriado de ratos após a indução da doença de

Parkinson e tratamento com GM1, pelos métodos de immunoblotting e imuno-histoquímica.

- III) Avaliar o comportamento por teste de cilindro, verificando déficits na assimetria motora.

4 Materiais e Métodos

4.1 Animais

Foram utilizados ao longo deste estudo ratos Wistar machos adultos, pesando 290g e fornecidos pelo biotério central da Universidade de São Paulo - Instituto de Ciências Biomédicas. Os animais foram mantidos sob luz (ciclo 12 / 12h) e temperatura (22 ± 2 ° C) controlada com acesso livre a comida e água. Os animais foram tratados de acordo com as orientações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e as orientações de cuidados de animais do Instituto Nacional de Saúde (NIH / EUA). O protocolo de estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade de São Paulo (protocolo n ° 60/2016). Cinco animais foram utilizados por grupo.

4.2 Indução do modelo de Parkinson

Os animais foram anestesiados com 2,2,2-tribromoetanol a 2,5% (Sigma, T48402) (1 ml / 100 g-250 mg / kg ip-Sigma®) e colocadas num aparelho estereotáxico. As coordenadas estereotáxicas em relação ao bregma utilizadas

foram: (I): AP: 0,48, L: -3 e DV: -4,5 mm / (II): AP: 1,28, L: -2,5 e V: - 5 mm (Paxinos e Watson, 2005). Em cada ponto injetou-se 0,5 µL de solução contendo 6 µg de 6-OHDA (totalizando uma dose final de 12 µg). As aplicações foram feitas com seringa Hamilton. A 6-OHDA (6-OHDA Cloridrato Sigma, H4381) foi diluída em solução salina e 0,3% de ácido ascórbico (REAL et al., 2013). Após a infusão concluída, a agulha foi mantida na região infundida durante 5 minutos, a fim de evitar o refluxo da solução. Depois de terminar a infusão, a incisão foi suturada e os animais foram mantidos isolados em gaiolas até recuperação completa.

4.3 Injeção do GM1 e Grupos

GM1 (TRB Pharma Chemical e Pharmaceutical Industries Ltd) foi diluído com 6-OHDA na mesma solução salina com ácido ascórbico a 0,3% e injetados no corpo estriado a 3 mg / kg de doses, onde cada rato recebeu 0,87 mg diluído em 1µl, em que cada ponto estereotático recebeu 0,435 mg diluídos em 0,5 µl (SCHNEIDER & YUWILER, 1989). Os Animais foram divididos em 4 grupos: grupo controle, salina, 6-OHDA e 6OHDA + GM1. Após sete dias, os animais foram sacrificados e os tecidos cerebrais foram processados para immunoblotting e imuno-histoquímica.

4.4 Qualificação e quantificação da Lesão Parkinsoniana

4.4.1 Imuno-histoquímica

Os animais foram profundamente anestesiados com cetamina (0,5 mg/mg de peso corporal, i.p Ceva) Xilazina (0,1 mg/mg de peso corporal, i.p Ceva) e, em

seguida, submetido a perfusão transcardíaca com 0,9% de NaCl, seguido por 4% de paraformaldeído em 0,1 M de tampão fosfato (pH 7,4 a 4°C). Os cérebros foram removidos, pós-fixados na mesma solução durante 4 horas e crioprotégido com 30% de sacarose em tampão fosfato 0,1 M durante 1 dia a 4°C. O tecido cerebral foi seccionado no plano transversal a uma espessura de 30 µm em criostato. Secções em flutuação livre foram lavadas em solução salina tamponada com fosfato (PBS) (0,01 M, pH 7,4). Após várias lavagens em PB, durante 30 minutos, as secções foram colocadas em soro de cabra normal a 5% (Vector, Burlingame, CA) durante 1 hora e, em seguida, incubadas durante 24 horas a 4°C com os anticorpos primários. Os anticorpos foram: monoclonal de camundongo anti-tirosina hidroxilase (1: 1000, Chemicon, Temecula, CA, EUA, MAB5280), monoclonal de camundongo anti-proteína ácida glial fibrilar (GFAP) (1: 1000, Sigma, St. Louis, Missouri, EUA, G3893) e monoclonal de camundongo anti-OX42 CD11b / c (1: 1000, BD Biosciences, Dickison, PA, EUA, 550299). Depois de lavadas em PB, as secções foram incubadas durante 120 minutos à temperatura ambiente com IgG de cabra biotinilada anti-camundongo (1:200; Jackson). Elas foram subsequentemente lavadas em PB e colocadas durante 120 minutos em um complexo avidinabiotina peroxidase (kit ABC, Vector); em 0,05% de tetrahidrocloreto de diaminobenzidina e 0,03% (concentração final) de peróxido de hidrogênio em PB. Imunomarcação foi revelada por uma incubação de 5 a 10 minutos com 0,5% de 3,3'-diaminobenzidina e cloreto carbono e titânio de 0,15% de peróxido de hidrogênio. O anticorpo monoclonal foi omitido nos controles negativos. As secções foram montadas em lâminas revestidas com gelatina, desidratados, e clareadas com xilol.

Para imunofluorescência, as secções foram lavadas durante 10 minutos (3x) em PB 0,1M, em seguida, por 10 minutos (1x) em Triton X- 100 (0,1%) + PB 0,1M.

As secções foram incubadas à temperatura ambiente durante 2 hs numa solução de bloqueio tampão fosfato de potássio (KPBS) + Soro Normal de burro (NDS) 5% + Triton X-100 (1%), seguido por incubação com um anticorpo monoclonal primário de coelho contra BDNF (1: 100, Madison, WI, EUA Promega, G7610) a 4°C, durante 48 horas. Após três lavagens de 5 minutos cada com KPBS, as secções foram incubadas durante 2 horas à temperatura ambiente, no escuro, com anticorpo secundário fluorescente AlexaFluor® 488 conjugado AffiniPure de burro anti- IgG de coelho (1: 750, Jackson ImmunoResearch Laboratories), seguido por três lavagens de 5 minutos cada com KPBS. Os cortes foram montados e a imunorreatividade foi capturada com um microscópio de fluorescência (Nikon E1000, Melville, NY, EUA) e Nikon Imaging Software, ACT-U usando uma objetiva de 10x. As medições foram tomadas a partir de 6 diferentes secções para cada animal. Uma análise quantitativa do material imunomarcado foi realizada com o programa IMAGE J, NIH / EUA.

4.4.2 Immunoblotting

Sete dias após o protocolo cirúrgico, os ratos foram sacrificados por decapitação (n = 5 / grupo) e o corpo estriado e o mesencéfalo ventral, incluindo o SN foram rapidamente coletados e homogeneizados a 4°C em tampão de extração (Tris-HCl, pH 8,0, 20 mM; 137 mM de NaCl, 1% de Triton X-100, 10% de glicerol, 1 mM de PMSF, 10 ug / ml de aprotinina, 1 ug / ml de leupeptina, 0,5% de ortogadadato de sódio). Os homogeneizados foram submetidos a centrifugação a 12.000 rpm durante 20 min, e a concentração de proteína do sobrenadante foi determinada usando um teste de proteína (Bio-Rad, Hercules, CA). O material foi armazenado em tampão Laemmli (Tris / HCl 125 mM, pH 6,8; 2,5% (p / v) SDS;

2,5% de 2- mercaptoetanol (2-ME), 4 mM de EDTA e 0,05% de azul de bromofenol) (Laemmli 1970) a -70 ° C.

As alíquotas contendo 75 µg de proteína foram dissolvidos em tampão de carga e aquecidos a 95 ° C durante 5 minutos. As proteínas correram em gel (6,5 e 12%) de poliacrilamida contendo dodecil de sódio sulfato (SDS-PAGE) e transferidas para membranas de nitrocelulose (Millipore, diâmetro 0,2µm). As membranas foram bloqueadas com leite desnatado (Molico, Nestlé) a 5% em tampão Tris-salino (NaCl 0,15 M e Tris 10 mM pH 7,5) durante 2 horas à temperatura ambiente, seguido por incubação com um anticorpo primário overnight a 4 ° C.

Os anticorpos primários incluíram monoclonal de camundongo antitirosina hidroxilase (1:1000, Chemicon, Temecula, CA, EUA, MAB5280), anticorpo monoclonal de camundongo anti- proteína ácida glial fibrilar (GFAP) (1: 1000, Sigma, St. Louis, Missouri, EUA, G3893) e monoclonal de coelho anti-caspase 3 (1:

1000, Cell Signaling Tecnologia, Denvers, MA, EUA, # 9665). Após três lavagens de 10 minutos cada, as membranas foram incubadas com anticorpos secundários anti-camundongo ou anti-coelho conjugados a peroxidase (1:10000 - Amersham Biosciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, Reino Unido). As bandas foram capturadas com o scanner SCAN-C (Li-Cor, EUA) e analisado para densidade óptica da imunorreatividade usando seu próprio software (C-Digit, EUA). As densidades ópticas de bandas de TH, GFAP e caspase-3 foram normalizadas em relação aos correspondentes às bandas de β-actina em cada experimento.

4.5 Teste de cilindro

Nesse teste simples e eficiente, foram avaliados déficits unilaterais no uso voluntário de membros anteriores, sendo amplamente utilizado em modelos unilaterais de DP (SCHALLERT et al., 2002; BROOKS E DUNNETT et al., 2009). O teste do cilindro foi realizado no dia 7 e 15 após a cirurgia (n=8). Os ratos foram colocados em um cilindro transparente (diâmetro: 20 cm, altura: 30 cm) por 5 minutos, com um espelho localizado atrás do cilindro para permitir uma visão de 360° (BOIX et al., 2015). O número de contatos das patas dianteiras na parede do cilindro foi contado (SCHALLERT et al., 2002). A pontuação do teste do cilindro foi calculada como o viés contralateral: $[(\text{número de contatos do membro contralateral}) / (\text{número total de contatos dos membros})] \times 100\%$ (BOIX et al., 2015). Os ratos saudáveis devem ter um desempenho de em média 50% neste teste (VERCAMMEN et al., 2006).

4.6 Análise estatística

Os dados foram normalizados pelo controle e submetidos à análise estatística utilizando o software GraphPad Prism 6.01 (San Diego, CA). As comparações entre os grupos foram realizadas com o teste ANOVA para medidas não repetidas, seguida por pós-teste Tukey quando a análise de variância mostrou uma diferença estatisticamente significativa. Para todos os testes, o nível de significância foi fixado em $p \leq 0,05$.

5 Resultados

5.1 Imuno-histoquímica

A imunorreatividade para tirosina-hidroxilase (TH) mostrou-se significativamente diminuída no estriado do grupo 6-OHDA em comparação com o grupo controle (22% - $p < 0,01$). Comparando o grupo tratado com GM1 em relação ao grupo 6-OHDA, houve um aumento significativo da expressão de TH (14% - $p < 0,05$), fazendo com que os níveis do grupo tratado com GM1 ficassem semelhantes aos níveis do grupo de controle (FIGURA 6 A e B). Na substância negra a TH também diminuiu significativamente no grupo 6-OHDA em comparação com o grupo controle (40% - $p < 0,0001$) e em relação ao grupo veículo (44% - $p < 0,0001$). O grupo tratado com GM1 exibiu um aumento da expressão TH em relação ao grupo 6-OHDA (37% - $p < 0,0001$) atingindo os níveis do grupo controle (FIGURA 6 C e D).

FIGURA 6 A e B, Imunomarcaco para tirosina hidroxilase (TH). No estriado os níveis de TH do grupo tratado com GM1 estão próximos aos níveis do grupo controle. C e D, imunomarcaco de TH na substância negra (SN) foi semelhante  do estriado. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $p < 0,001$ **** $p < 0,0001$. Escala de 100 μm .

A marcao para GFAP no estriado mostrou um aumento significativo após a aplicao de 6-OHDA em comparao com o grupo controle (41% - $p < 0,01$) e o grupo veículo (46% - $p < 0,01$). Comparando-se o grupo tratado com GM1 com o grupo 6-OHDA, houve uma reduo da expressão de níveis de proteína GFAP (41% - $p < 0,01$) (FIGURA 7 A e B). Da mesma forma, a imunomarcaco de GFAP na SN exibiu um aumento significativo após a injeo de 6-OHDA em comparao com o grupo controle (41% - $p < 0,01$) e o grupo veículo (45% - $p < 0,05$). Também na SN,

houve uma redução de coloração GFAP em relação ao grupo de 6-OHDA (40% - $p < 0,05$) depois do tratamento com GM1 (FIGURA 7 C e D).

FIGURA 7 A e B, Imunomarcção para GFAP no estriado. O aumento de GFAP no corpo estriado é menor no grupo tratado com GM1 em relação ao grupo lesado com 6-OHDA. C e D, os resultados para a SN são semelhantes aos encontrados no estriado. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$. Escala de 100 μ m.

No estriado, a imunomarcção para OX-42 no grupo 6-OHDA foi significativamente aumentada quando comparado com o grupo controle (50% - $p < 0,05$) e o grupo veículo (39% - $p < 0,05$). O grupo tratado com GM1 mostrou seus níveis de expressão da proteína de OX-42 semelhante ao do grupo controle (FIGURA 8 A e B), demonstrando uma redução significativa em relação ao grupo tratado com 6-OHDA (32% - $p < 0,05$). O grupo 6-OHDA mostrou um aumento

significativo da marcação com OX-42 na SN, quando comparado com o grupo controle (51% - $p < 0,05$) e o grupo veículo (42% - $p < 0,05$). O grupo tratado com GM1 mostrou seus níveis de expressão da proteína de OX-42 semelhante ao do grupo controle, e mostrou uma diminuição significativa em relação ao grupo 6-OHDA (46% - $p < 0,05$) (FIGURA 8 C e D).

FIGURA 8 A e B, Imunomarcção para OX-42 no estriado. O aumento de OX-42 no corpo estriado é menor no grupo tratado com GM1 deixando seus níveis próximos aos níveis do grupo controle. C e D, o resultado foi bastante semelhante para a SN. * $P < 0,05$. Escala de 100 μm .

Numa análise por imunofluorescência no corpo estriado, as células BDNF-positivas foram significativamente reduzidas após a injeção de 6-OHDA, quando comparado com o grupo de controle (31% - $p < 0,05$) e também diminuiu significativamente quando comparado com o grupo veículo (33% - $p < 0,01$). O grupo

tratado com GM1 mostrou um aumento (32% $p < 0,05$) em comparação com o grupo 6-OHDA, retornando o BDNF para os níveis do grupo controle (FIGURA 9 A e B). Na SN, células BDNF-positivas também mostraram uma redução significativa após a injeção de 6-OHDA (59% - $p < 0,01$) em comparação com o grupo de controle, e também mostrou uma diminuição significativa da expressão de BDNF no grupo 6-OHDA quando comparado com o grupo veículo (60% - $p < 0,01$). Da mesma forma que as conclusões no estriado, os níveis de BDNF na SN após a injeção de GM1 alcançaram os níveis dos encontrados no grupo controle e em comparação com o grupo 6-OHDA, o número de células de BDNF na SN mostraram um aumento significativo (57% - $p < 0,05$) (FIGURA 9 C e D).

FIGURA 9 A e B, Imunofluorescência para BDNF no estriado. Os níveis do grupo tratado com GM1 ficaram próximos aos do grupo controle. C e D, o resultado foi repetido na análise da SN. * $P < 0,05$, ** $p < 0,01$. Escala de 100 μm .

5.2 Immunoblotting

A expressão de tirosina-hidroxilase no estriado diminuiu significativamente no grupo 6-OHDA em comparação com o grupo controle (58% $p < 0,01$) e grupo do veículo (57% - $p < 0,01$). O grupo tratado com GM1 demonstrou seus níveis de expressão de proteína TH semelhante ao do grupo controle, com um aumento significativo em relação ao grupo lesado com 6-OHDA (60% - $p < 0,05$) (FIGURA 10 A). No mesencéfalo, a TH foi também significativamente reduzida no grupo 6-OHDA comparada com o grupo controle (29% - $p < 0,05$) e do grupo veículo (34% - $p < 0,05$). O grupo tratado com GM1 mostrou níveis próximos do grupo controle, com um aumento significativo em relação ao grupo 6-OHDA (26% - $p < 0,05$) (FIGURA 10 B).

FIGURA 10 A No estriado o grupo tratado com GM1 manteve seus níveis próximos aos do grupo controle. B No mesencéfalo os resultados foram similares aos encontrados no estriado. * $P < 0,05$, ** $p < 0,01$.

No estriado, 6-OHDA promoveu um aumento da expressão da caspase-3 equivalente a 69% em comparação com o grupo controle ($p < 0,001$) e também um aumento significativo em comparação com o grupo veículo (41% $p < 0,01$). No grupo tratado com GM1 os níveis de caspase-3 foram semelhantes aos do grupo controle, e significativamente diminuída em comparação com o grupo 6-OHDA (62% - $p < 0,001$) (FIGURA 11 A). A expressão da caspase-3 no mesencéfalo aumentou significativamente no grupo 6-OHDA em comparação com o grupo controle (48% - $p < 0,001$) e o grupo veículo (59% $p < 0,0001$), enquanto que no grupo tratado com GM1 os níveis de caspase-3 foram semelhantes aos do grupo controle, e significativamente diminuídos em comparação com o grupo 6-OHDA (43% - $p < 0,001$) (FIGURA 11 B).

FIGURA 11 A No estriado o grupo tratado com GM1 demonstrou uma diminuição da expressão de caspase-3 em relação ao grupo 6-OHDA, mantendo seus níveis próximos aos do grupo controle. B No mesencéfalo os resultados foram similares aos encontrados no estriado. * $P < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

A expressão de GFAP no corpo estriado foi significativamente aumentada após a injeção de 6-OHDA em comparação com o grupo controle (36% - $p < 0,01$) e também com o grupo veículo (40% - $p < 0,01$). No grupo tratado com GM1 os níveis de GFAP foram semelhantes aos do grupo controle e demonstraram uma redução significativa em comparação com o grupo 6-OHDA (34% - $p < 0,01$) (FIGURA 12 A). A expressão de GFAP no mesencéfalo mostrou um aumento significativo após a aplicação do 6-OHDA (40% - $p < 0,05$). Os dados para o mesencéfalo foram semelhantes para o estriado, pois o grupo tratado com GM1 mostrou seus níveis de expressão de GFAP semelhantes ao grupo de controle e diminuição significativa em comparação com o grupo 6-OHDA (55% - $p < 0,01$) (FIGURA 12 B).

FIGURA 12 A No estriado o grupo tratado com GM1 demonstrou uma diminuição da expressão de GFAP em relação ao grupo 6-OHDA, mantendo seus níveis próximos aos do grupo controle. B No mesencéfalo os resultados foram similares aos encontrados no estriado, porem não houve aumento significativo do grupo 6-OHDA em relação ao grupo controle. * $P < 0,05$, ** $p < 0,01$

5.3 Teste de cilindro

No teste do cilindro foram observados os ratos em dois tempos diferentes, 7 dias e 15 dias. No 7º dia pós-cirurgia podemos identificar que no grupo veículo os ratos utilizaram significativamente mais ambas patas em relação ao uso da pata (38%, # $p < 0,0001$) contralateral e (39%, # $p < 0,0001$) ipsolateral. No grupo lesado com 6-OHDA pode-se observar que os ratos utilizaram significativamente mais a pata ipsolateral em relação à utilização de ambas as patas (29%, # $p < 0,0001$) e a pata contralateral (44%, # $p < 0,0001$), e houve também um aumento da utilização de ambas as patas em relação à utilização da pata contralateral (15%, ** $p < 0,01$), o que demonstra um comprometimento motor unilateral. No grupo 6-OHDA+GM1 os resultados observados foram semelhantes aos do grupo veículo, onde os ratos utilizaram significativamente ambas patas em relação ao uso da pata contralateral (49%, # $p < 0,0001$) e ipsolateral (49%, # $p < 0,0001$). No grupo GM1 observou-se resultados similares também ao grupo veículo, onde os ratos utilizaram significativamente mais ambas patas em relação ao uso da pata contralateral (60%, # $p < 0,0001$) e ipsolateral (56%, # $p < 0,0001$) (FIGURA 13).

No 15º dia pós-cirurgia pudemos identificar uma manutenção dos resultados encontrados no 7º, onde no grupo veículo os ratos utilizaram significativamente ambas patas em relação ao uso da pata contralateral (77%, # $p < 0,0001$) e ipsolateral (78%, # $p < 0,0001$). Porém, no grupo lesado com 6-OHDA pode-se observar significativamente que os ratos utilizaram mais a pata ipsolateral em relação à utilização de ambas as patas (17%, ** $p < 0,01$) e a pata contralateral (19%, ** $p < 0,01$), e houve também um aumento da utilização de ambas as patas em relação à utilização da pata contralateral (2%, * $P < 0,05$), no entanto, com menor

significância que no 7º dia, o que demonstra um comprometimento motor unilateral, mas que com o passar dos dias pós lesão esse comprometimento diminui. No grupo 6-OHDA+GM1 os resultados observados foram semelhantes aos do grupo veículo, onde os ratos utilizaram significativamente ambas patas em relação ao uso da pata contralateral (56%, # $p < 0,0001$) e (51%, # $p < 0,0001$) ipsilateral. No grupo GM1 observaram-se resultados similares também ao grupo veículo, similares aos encontrados no 7º dia, onde os ratos utilizaram significativamente mais ambas patas em relação ao uso da pata contralateral (60%, # $p < 0,0001$) e ipsilateral (62%, # $p < 0,0001$) (FIGURA 14).

FIGURA 13 Teste de Cilindro. Avaliação da assimetria por 5 minutos dos membros anteriores em ratos parkinsonianos tratados com GM1 7 dias pós cirurgia. Os animais sofreram lesão intraestriatal com 6-OHDA e/ou foram tratados com GM1. ** $p < 0,01$, # $p < 0,0001$.

FIGURA 14 Teste de Cilindro. Avaliação da assimetria por 5 minutos dos membros anteriores em ratos parkinsonianos tratados com GM1 15 dias pós cirurgia. Os animais sofreram lesão intraestriatal com 6-OHDA e/ou foram tratados com GM1 . * $P < 0,05$, ** $p < 0,01$, # $p < 0,0001$.

6. Discussão

A DP é uma doença degenerativa, é comum nos idosos e sua etiologia e patogênese não estão completamente elucidadas. De qualquer forma, o que a literatura demonstra é que existem de fato alguns fatores inflamatórios bastante evidentes envolvidos com a doença (TEISMANN & SCHULZ, 2004), além de declínio de algumas enzimas muito importantes para o funcionamento normal do sistema cognitivo, como por exemplo TH, com consequente diminuição de produção de DA, com morte de neurônios dopaminérgicos nos gânglios basais, principalmente na SN, resultando em diminuição da transmissão de dopamina no estriado (DAUER & PRZEDBORSKI, 2003).

Com essas evidências os estudos sobre possibilidades terapêuticas permeiam essas teorias citadas acima. Desse modo, esse estudo caminhou no sentido de estudar proteínas ligadas a aspectos inerentes a problemas constatados em pacientes com DP, a neuroproteção, a neuroinflamação, a morte celular e uma parte comportamental para elucidar melhor o potencial terapêutico do GM1 aplicado por via central.

Os resultados encontrados neste estudo corroboram achados da literatura sobre os benefícios fornecidos pelo gangliosídeo GM1 na DP, mostrando a capacidade do GM1 ser um potencial agente neuroprotetor e/ou facilitar a recuperação após a degeneração do sistema dopaminérgico nigroestriatal (SCHNEIDER & YUWILER., 1989, SCHNEIDER et al., 1992), evidenciados pela imunorreatividade para TH, onde nossos resultados foram bastantes promissores, já que o grupo tratado com GM1 manteve níveis de TH significativamente maiores que o grupo lesado com 6-OHDA, e níveis próximos aos níveis de TH do grupo controle.

Estudamos também proteínas relacionadas com a neuroinflamação. Como foi demonstrado por Morales et al (2016), o papel dos astrócitos após degeneração dopaminérgica em modelo de 6-OHDA, é importante, evidenciando assim uma astrocitose grave, com consequente aumento da expressão de GFAP, semelhante em seres humanos com DP. Nesse contexto, nossos resultados foram semelhantes aos encontrados por MORALES et al. (2016) no modelo de 6-OHDA, e o grupo tratado com GM1 mostrou uma menor expressão de GFAP, indicando que a astrocitose grave provocada por 6-OHDA foi impedida por tratamento com GM1, sugerindo assim, a sua eficácia para diminuir neuroinflamação. Como sabe-se que acompanhada dessa astrocitose característica da DP, existem também muitas microglias ativadas, que liberam diversas neurotoxinas e fatores inflamatórios

(TEISMANN & SCHULZ, 2004), logo, torna-se necessário a investigação a respeito das mesmas. Nesse sentido, investigamos a proteína OX-42 (CD11 b/c), um conhecido marcador microglial e interessante, verificamos que o GM1 diminuiu significativamente a ativação microglial quando comparado com o grupo lesado com 6-OHDA.

Obviamente que com essa série de eventos de diminuição de fatores neuroprotetores e aumento de fatores pró inflamatórios na DP, a consequência natural dessa complexa desregulação é a morte celular. A maneira que utilizamos para essa investigação foi a quantificação da expressão da caspase-3. Nossos resultados demonstraram que o grupo tratado com GM1 não demonstrou aumento de caspase-3 quando comparado com o grupo 6-OHDA, sugerindo assim que o papel neuroprotetor do GM1 impede a apoptose neuronal característica da DP. Nosso resultado reforça os achados do trabalho realizado por GIOVANNA & LLOYD (1998), onde sugerem que o GM1 é um potencial agente anti-apoptótico.

Todos os resultados benéficos para a GM1 encontrados neste estudo e os descritos na literatura parecem estar relacionados principalmente ao fato de que o GM1 apresenta uma capacidade impressionante para aumentar os fatores neurotróficos (CUELLO et al., 1989). É de salientar que está eficiência do GM1 é geralmente vista em estudos com protocolos compostos por tratamentos prolongados e em cultura de células, mas ainda não foram descritas após a aplicação aguda e intraestriatal. Neste contexto, podemos ver que, com a aplicação aguda o efeito de GM1 na proteção de fatores neurotróficos é mantido, visto que a quantidade de BDNF no grupo tratado com GM1 é bastante semelhante ao do grupo controle. Deve-se salientar que a expressão de BDNF é significativamente reduzida no grupo de 6-OHDA, o que é característica de doenças neurodegenerativas.

A via de aplicação de GM1 é fundamental para melhorar o potencial terapêutico da droga. Em diversos estudos, os resultados promissores para o GM1 podem ainda ser melhorados com um melhor fornecimento do fármaco para o cérebro, pois quando aplicada perifericamente GM1 tem uma dificuldade em atravessar a barreira hematoencefálica (SCHENGRUND & MUMMERT., 1998). É importante destacar que TOFFANO et al. (1984) não observou esses benefícios no modelo de 6-OHDA, sugerindo alguma limitação do modelo, porém TILSON et al. (1988) demonstraram que uma diferença técnica poderia ser o aspecto principal desta conclusão, uma vez que TOFFANO et al. (1984) começaram o tratamento com GM1 intraperitoneal dois dias após lesão com 6-OHDA. No trabalho de TILSON et al. (1988) e no presente estudo, o tratamento foi iniciado imediatamente após a injeção de toxina e/ou concomitante. Neste contexto, vários trabalhos estudam os efeitos terapêuticos do GM1 no modelo de 6-OHDA porém com injeções intraperitoneais (KOJIMA et al, 1984; JONSSON, et al, 1985; AGNATI, et al 1985; RENSHI, et al 2014), com a técnica de criopreservação de tecido (SAUTTER, et al, 2000) e com as culturas de células (FADDA et al., 1993).

Os resultados encontrados na análise comportamental demonstraram que o 6-OHDA diminui a utilização de ambas as patas com consequente aumento de utilização da pata ipsolateral, indicando a capacidade desse modelo em gerar danos motores finos, corroborando a literatura (WOODLEE et al., 2008). O GM1 atenuou esses efeitos induzidos pela lesão com 6-OHDA invertendo os achados que foram parecidos ao grupo veículo, destacando a capacidade neuroprotetora do GM1. O teste de assimetria de uso de membros é sensível a uma variedade de níveis de depleção de dopamina (LI-HONG SHI, et al., 2004) e o entendimento dessa melhora comportamental presente nesse estudo explica-se com os achados bioquímicos

destacados acima, principalmente com a manutenção dos níveis de TH aos níveis basais no grupo tratado. A assimetria de uso de membros também pode ter relevância clínica. Os membros anteriores são usados para iniciar movimentos que requerem mudança de peso, bem como pernas são usadas por humanos quando eles andam. Dificuldade em iniciar etapas de uma posição postural ou recuperação do centro de gravidade, é um dos principais sinais de degeneração extensa de neurônios da SN (LI-HONG SHI, et al., 2004). Nesse contexto, o GM1 demonstrou-se uma capacidade bioquímica e comportamental terapêutica bastante interessante e promissora.

Pensando clinicamente, uma rota que se aproximaria mais de perto a aplicação intraestriatal seria a via intratecal, já reconhecida como um caminho possível para entregar alguns medicamentos, incluindo GM1 (MAO., 1992). Desta forma, não há dúvida de que a oferta de GM1 para as áreas do cérebro poderia ser significativamente aumentada, resultando em um potencial de melhoria terapêutica, incluindo a vantagem de uma possibilidade de redução da dose de GM1, visto que nosso trabalho utilizou uma dose bastante inferior quando comparados a doses aplicadas por via periférica.

7. Conclusão

Os dados deste estudo sugerem que uma dose única de GM1 intraestriatal pode produzir um efeito neuroprotetor marcante no modelo de 6-OHDA de doença de Parkinson.

O GM1 demonstrou ter um grande potencial terapêutico, visto que possui uma capacidade em impedir morte celular e reduzir a neuroinflamação. É possível

concluir que GM1 é capaz de atenuar os efeitos neurodegenerativos característicos promovidos em um modelo animal da DP e induzir preservação dos movimentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGID, Y. **Parkinson's disease: pathophysiology**. Lancet, 1991.

AGNATI, L. F., et al. Effects of chronic GM1 ganglioside treatment on nigral dopamine cell bodies and dendrites in experimental rats using image analysis – relationship to the pharmacokinetic properties. Proceedings of an International Symposium held at The Wenner-Gren center, Stockholm, May 3-4, **Quantitative Neuroanatomy in transmitter Research**, p. 145-156, 1985.

AHLSSKOG J.E., M.D. MUENTER, Frequency of levodopa-related dyskinesias and motor fluctuations as estimated from the cumulative literature, **Mov Disord** 16 448-458, 2001.

ANDERSON R.G. The caveolae membrane system. Annu. Rev. **Biochem**, 67, 199–225. 1998

ASAD DALIA et al. Tyrosine hydroxylase and aromatic l-amino acid decarboxylase in mesencephalic cultures after MPP+: the consequences of treatment with GM1 ganglioside, **Brain Research**, 742, 260-264, 1996.

BARNHAM, K.J.; MASTERS, C.L.; BUSH, A.I. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. **Nat. Rev. Drug Discov**, v.3, n.3, p. 202-214, 2004.

BLUM, D. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. **Prog Neurobiol**, v. 65, n.2, p. 135-172, 2001.

BOSSY-WETZEL, E.; SCHWARZENBACHER, R.; LIPTON, S.A. Molecular pathways to neurodegeneration. **Nat Med**, v.10, p. s2-s9, 2004.

BOIX J., et al. A partial lesion model of Parkinson's disease in mice—Characterization of a 6-OHDA-induced medial forebrain bundle lesion. **Behav. Brain Res.** 284: 196–206, 2015.

BRAAK, H et al. The staging procedure for the inclusion body pathology associated with sporadic Parkinson's disease reconsidered. **Mov Disord**, v.21, p.2042-2051, 2006.

BRADLEY, W.G et al. Neurobiology in clinical practice. v. II. Boston: Butterworth-Heinemann, 1991.

BROOKS P., S & DUNNETT S., B. Tests to assess motor phenotype in mice: a user's guide. **Nature Reviews Neuroscience**, 10: 519-529, 2009.

CALNE, D.G. Is idiopathic parkinsonism the consequence of an event or a process? **Annals of neurology**, v.44, p. 05-10, 1994.

CASAMENTI, F., et al. Effects of ganglioside treatment in rats with a lesion of the cholinergic forebrain nuclei. **Brain Res**, 338: 45-52, 1985.

CECARELLI, B., et al. Effects of brain gangliosides on function recovery in experimental regeneration and reinnervation. **Adv.Exp.Med.Biol**, 71:275-293, 1976.

CUELLO, A.C., et al. Retrograde changes in the nucleus basalis of the rat, caused by cortical damage, are prevented by exogenous ganglioside GM1. **Brain Res**, 376-377, 1986.

DAUER, W., & PRZEDBORSKI S. Parkinson's disease: mechanisms and models. **Neuron** 39(6):889–909, 2003.

DAVIS, R.L.; ROBERTSON, D.M. **Textbook of Neuropathology**. 3ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1997.

DI MARTINO A., SAFAR J., CERONI M. AND GIBBS C.J.J. Inactivation of the scrapie agent in a scaled-down procedure for the purification of gangliosides from brain tissue. **Dev. Biol. Stand.** 80: 187-194, 1993.

DICKSON, D. Neurodegeneration: The Molecular Pathology of Dementia and Movement Disorders. **ISNNeuropath Press**, 2003.

DOHERTY, P., et., al. Ganglioside GM1 does not initiate, but enhances neurite regeneration of nerve growth factor-dependent sensory neurones. **JNeurochem**, 44 (4): 1259-1965, 1985.

DUCHEMIN A. M., et al. GM1-induced activation of phosphatidylinositol 3-kinase: involvement of Trk receptors. **J. Neurochem**. 104: 2466–1477, 2008.

ELLISON, D. et al. Neuropathology: A reference text of CNS Pathology. 2 ed. Edinburgh: Mosby, 2004.

ERIN N.N et al. GM1 ganglioside enhances Ret signaling in striatum. **JNeurochem**, 130: 541-554, 2014.

FADDA E., et al., Ganglioside GM1 cooperates with brain-derived neurotrophic factor to protect dopaminergic neurons from 6-OHDA-induced degeneration. **Neuroscience Letters**. 159: 147-150, 1993.

FEARNLEY, J.M.; LEES, A.J. Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. 1991. p.2283-2301.

FELDBURG, W. Present views on the mode of action of acetylcholine in the central nervous system. **Physiol Rev**, v.25, p.596-642, 1945.

GIOVANNA F. & Lloyd A., G. Promotion of neuronal survival by GM1 Ganglioside: Phenomenology and mechanism of action. **Ann N Y Acad Sci.** 845, 263-73, 1998.

GOETTL, V.M., et al. Sciatic nerve axotomy in aged rats: response of motoneurons and the effect of GM1 ganglioside treatment. **Brain Res**, 968: 44-53, 2003.

GOODWIN, V.A. et al. The effectiveness of exercise interventions for people with Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. **Mov Disord**, v.23, n.5, p.631-640, 2008.

GUSHENG WU et al. Mice Lacking Brain Gangliosides Develop Parkinsonism. **Neurochem Res.** 36:1706-1714, 2011.

GUSHENG WU et al. Deficiency of Ganglioside GM1 Correlates with Parkinson's Disease in Mice and Humans. **Neuro. Res.** 90:1997-2008, 2012.

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

HAKOMORI S et al. New insights in glycosphingolipid function: "glycosignaling domain," a cell surface assembly of glycosphingolipids with signal transducer

molecules, involved in cell adhesion coupled with signaling. **Glycobiology**, 8: xi–xix, 1998.

HADJICONSTANTINO, M et al. Administration of GM1 ganglioside restores the dopamine content in striatum after chronic treatment with MPTP. **Neuropharmacology**. 25: 1075-1077. 1986.

HADJICONSTANTINO M. N & NEFF N. H. GM1 ganglioside: in vivo and in vitro trophic actions on central neurotransmitter systems. **J. Neurochem**. 70: 1335–1345, 1998.

HADJICONSTANTINO M. N & NEFF N. H. GM1 ganglioside: Commonalities of action with neurotrophins, in *Neurobiology of the Neurotrophins*, (Mocchetti I., ed.), pp. 427–453. **FP Graham Publishing Co.**, Johnson City, TN, 2000.

HYDEYOSHI, H & NAI HONG C. Ganglioside Protein Kinase signals triggering cytoskeletal actin reorganization. **Glycoconj. J**. 20:49, 2003.

HUGHES, A.J. et al. A clinicopathologic study of 100 cases of Parkinson's disease. **Arch Neurol**, v.50, n.2, p.140-148, 1993.

HUNOT S, BRUGG B, RICARD D, et al. Nuclear translocation of NF-kappaB is increased in dopaminergic neurons of patients with Parkinson disease. **Proc Natl Acad Sci USA**, 94:7531–6, 1997.

JELLINGER, K. et al. Chemical evidence for 6-hydroxydopamine to be an endogenous toxic factor in the pathogenesis of Parkinson's disease. **J Neural Transm Suppl**, v.46, p.297-314, 1995.

JEON, B.S et al. 6-Hydroxydopamine lesion of the rat substantia nigra: time course and morphology of cell death. **Neurodegeneration**, v.4, n.2, p.131-137, 1995.

JONSSON, G., et al. Effects of GM1 ganglioside on developing and mature serotonin and noradrenaline neurons lesioned by selective neurotoxins. **ActaPhysal Scand**. 542, 125. 1985.

KARPIAK, S. E et al. Gangliosides (GM1 and AGF2) reduce mortality due to ischemia: Protection of membrane function. **Stroke**, 18: 184-187, 1987.

KLENK, E. Hoppe Seyler's Z. **Physiol. Chem**, 235: 24-36, 1935.

KOLTER T et al. Combinatorial ganglioside biosynthesis. **J Biol Chem**, 277:25859-2586, 2002.

KOJIMA, H., et al. GM1 ganglioside enhances regrowth of noradrenaline nerve terminaes in rat cerebral cortex lesioned by the neurotoxin 6-OHDA. **Neuroscience**.13, 1011-1022, 1984.

LAEMMLI U.K.. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 227, pp. 680–685, 1970.

LEDEEN RW & WU G. Nuclear sphingolipids: metabolism and signaling. **J. Lipid Res**, 49:1176–1186, 2008.

LEDEEN RW & WU G. The multi-taked life of GM1 ganglioside, a true factotum of nature. **Trends Biochem Sci**, 40(7):407-18, 2015.

LI-HONG SHI, et al. High-frequency stimulation of the subthalamic nucleus reverses limb-use asymmetry in rats with unilateral 6-hydroxydopamine lesions. **Brain Research**, 1013: 98 – 106, 2004.

LOTHARIUS, J.; BRUNDIN, P. Pathogenesis of Parkinson s disease: Dopamine, visicles and α -synuclein. **Nat Rev Neurosci**, v.3, n.12, p.833-842, 2002.

LUTHMAN, J. et al. Selective lesion of central dopamine or noradrenaline neuron systems in the neonatal rat: motor behavior and monoamine alterations at adult stage. **Behav Brain Res**, v.33, p.267-277, 1989.

MAO J., et al., 1992. Intratechal GM1 ganglioside and local nerve anesthesia reduce nociceptive behaviors in rats with experimental peripheral mononeuropathy. **Brain Research**. 584, 28-35.

MAHADIK., S.,P & KARPIAK ., S., K. Gangliosides in treatment of neural injury and disease. **Drug Development Research**. 15: 337-360, 1988.

MEREDITH, G.E. et al. Animal models of Parkinson s disease progression. **Acta Neuropath**, v.115, p.185-398, 2008.

MORALES I. et al.. The astrocytic response to the dopaminergic denervation of the striatum. **J. Neurochem**. 139, 81-95. 2016.

NAGAHARA A.H., TUSZYNSKI M.H.. Potential therapeutic uses of BDNF in neurological and psychiatric disorders. **Nat Rev Drug Discov**, 10 (3), pp. 209–219, 2011.

OBATA K., et al. Effects of glycolipids on in vitro development of neuromuscular junction. **Nature**, 266: 369-371. 1977.

OLANOW, C.W. et al. The effect of deprenyl and levodopa on the progression of Parkinson's disease. **Ann Neurol**, v.38, p.771-777, 1995.

OLANOW, C.W. The scientific basis for the current treatment of Parkinson s disease. **Annu Rev Med**, v.55, p.41-60, 2004.

PAXINOS G.; WATSON C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates (third ed.) **Academic Press**, San Diego, 2005.

PORTER, C.C et al. Effect of 6-hydroxydopa-mine and some other compounds on the concentration of norepinephrine in the hearts of mice. **J Pharmacol Exp Ther**, v.140, p.308-316, 1963.

RAHMANN, H. Brain gangliosides and memory formation. **Behavioral Brain Research 66**: 105-116.

REAL C, C., et al. BDNF receptor blockade hinders the beneficial effects of exercise in a rat model of Parkinson's disease. **Neuroscience**, 237:118–129, 2013.

REIVICH, M., et al. The action of GM1 ganglioside on the hemodynamic and metabolic effects of ischemia. **Clinical Neuropharmacology**, Raven Press, NY, 7 (Suppl. 1): S325, 1984.

RENSHI X., et al. The possible mechanism of Parkinson's disease progressive damage and the preventive effect of GM1 in the rat model induced by 6-hydroxydopamine. **Brain Research**. 1592, 72-81. 2014.

SACHS, C. & JONSSON, G. Mechanisms of action of 6-hydroxydopamine. **Biochem Pharmacol**, v.24, n.1, p.1-8, 1975.

SAUTTER, J. et al. Systemic treatment with GM1 Ganglioside improves Survival and function of Cryopreserved Embryonic Midbrain Grafted to the 6OHDA – Lesioned rat Striatum. **Experimental Neurology**. 164, 121-129. 2000.

SCHALLERT, T., et al. Disentangling multiple types of recovery from brain injury. In: Kriegstein, J., Klumpp. (Eds.), **Pharmacology of Cerebral Ischemia**. Medpharm Scientific, 2002.

SCARPINO, O., et al. GM1 ganglioside therapy in acute ischemic stroke. **Cerebral Ischemia and Dementi**. 435-442, 1991.

SCHAPIRA, A.H.V. Neurobiology and treatment of Parkinson disease. **Trends Pharmacol Sci**, v.30, p.41-47, 2009.

SCHENGRUND C.L, MUMMERT C.M. Exogenous gangliosides. How do they cross the blood-brain barrier and how do they inhibit cell proliferation. **Ann N Y AcadSci** 845, 278-84. 1998.

SCHNEIDER, J., S & YUWILER A. GM1 ganglioside treatment promotes recovery of striatal dopamine concentrations in the mouse model of MPTP induced parkinsonism. **Exp. Neurol**. 105, 177-183. 1989.

SCHNEIDER, J., S., et al. Recovery from experimental Parkinson's in primates with GM1 ganglioside treatment. **Science** 256: 843-846, 1992.

SCHNEIDER, L., S., et al. The therapeutic role of gangliosides in neurological disorders. **CNS Drugs**. 3, 2013-222. 1994.

SCHNEIDER, J., S., et al. GM1 ganglioside in Parkinson's disease: Results of a five year open study. **Neurological Sciences**.292, 56-51. 2010.

SCHNEIDER, J., S., et al. A randomized, controlled, delayed start trial of GM1 ganglioside in treated Parkinson's disease patients. **Neurological Sciences**.324, 140-148, 2013.

SCHÖBER, A. Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. **Cell Tissue Res**. 318(1):215-24, 2004.

SMEYNE M et al., Glia cell number modulates sensitivity to MPTP in mice. *Glia*. Nov 1;52(2):144-52, 2005.

SENOH, S.; WITKOP, B. Non-enzymatic conversions of dopamine to norepinephrine and trihydroxyphenethylamines. **J Am Chem Soc**, v.81, p.6222-6231, 1959.

SETHI K. Levodopa unresponsive symptoms in Parkinson disease, *Mov Disord* 23 Suppl 3 S521-533, 2008.

SIMONS K, TOOMRE D. Lipid rafts and signal transduction. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol**, 1:31–39, 2000.

SKAPER, S. D., et al. GM1 ganglioside accelerates neurite outgrowth from primary peripheral and central neuron under selected culture conditions. **Brain Res**, 23: 19-26, 1985.

SVENNERHOLM L. Composition of gangliosides from humans brain. **Nature**. 177: 524-525, 1956.

SVENNERHOLM L. Isolation of gangliosides. **Acta Chemica Scandinavica**. 17: 239-250.

SVENNERHOLM L. Designation and schematic structure of gangliosides and allied glycosphingolipids. **Prog. Brain Res**. 101: XI-XIV, 1994.

TILSON, H., A., et al. Ganglioside interactions with the dopaminergic system of rats. **J Neuroscience Research**. 19, 88-93. 1988.

TETTAMANTI, G., et al. The fate of exogenously administered brain gangliosides. In: Rapport, M. M. & Gorio, A. Gangliosides in Neurological and Neuromuscular Function, Development, and Repair. **Raven Press**, 225-240, 1981.

TETTAMANTI, G & RIBONI, L. Gangliosides and modulation of the function of neural cells. **Advances in lipid Research**. 25, 253-267. 1993.

TEISMANN P & SCHULZ JB. Cellular pathology of Parkinson's disease: astrocytes; microglia and inflammation. **Cell Tiss Res**. 318:149–61. 2004.

TOFFANO G., et al. Effect ganglioside treatment on the recovery of dopaminergic nigro striatal neurons after different types of lesion. **ActaPhysal Scand.** 122, 313-321. 1984.

TRETIKOFF C. Contributions a l'etude de l'anatomie pathologique du locus niger de soemmering avec quelques deductions relatives a la pathogenie des troubles de tonus musculaire et de la maladie de Parkinson. (Thesis, Paris). 1919.

WIEGANDT H. The chemical contitution of gangliosides of the vertebrate nervous system. **Behav.** 66: 85-97, 1995.

WOODLEE, M. T., et al. Enhanced function in the good forelimb of hemi-parkinson rats: Compensatory adaptation for contralateral postural instability? **Experimental Neurology.** 211: 511-7, 2008.

VERCAMMEN L., et al. Parkin protects against neurotoxicity in the 6-hydroxydopamine rat model for Parkinson's disease. **Mol. Ther.** 14: 716–723, 2006.

XIAO-HONG BA. Therapeutic effects of GM1 on Parkinson's disease in rats and its mechanism. **International Journal of Neuroscience**, 1543-5245, 2014:

YAMASHIDAT.R, et al. Interruption of ganglioside synthesis produces central nervous system degeneration and altered axonglial interactions. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 102: 2725-2730, 2005.

YU, R. K & SAITO, M. Structure localization of brain gangliosides. In: Margolis, R.U., Margolis, R.K. (eds.), **Neurobiology of Glycoconjugates**, pp 1-41, 1989.

YU, R. K & SAITO, M. Gangliosides and neuronal-astrocytic interactions. **Progress in Brain Research**. 94: 333-338, 1992.