

Morte de ratos tratados com GM1 ou com salina após ablação de colículo

Luciane Fátima do Nascimento¹, Danielle Cristina Ferreira² e Margarete Nakatani^{3*}

Introdução

Os gangliosídeos podem ser considerados agentes tróficos envolvidos nos estágios de desenvolvimento, diferenciação e sobrevivência neuronal, assim como também nas patologias que os afetam. Por este motivo tem sido usado em tratamentos experimentais, mas seu papel ainda não está claro devido à enorme complexidade de interações celulares e seu mecanismo de ação e regulação [1]. Uma espécie de gangliosídeo, o monossialogangliosídeo (GM1), têm mostrado interagir e exibir efeitos protetores no processo de morte celular em eventos como a isquemia retiniana *in vivo* ou excitotoxicidade *in vitro* e é utilizado em tratamentos experimentais em uma série de doenças neurodegenerativas e traumas neurológicos [2].

Vários modelos de morte celular podem ser usados para testar tais atividades tróficas e neuroprotetoras no processo de morte celular, entre elas o modelo de morte celular induzida por axotomia de células ganglionares. Resultados anteriores mostraram que o tratamento de células em processo apoptótico com neurotrofinas e GM1 exogenamente potencializou ou mimetizou os efeitos tróficos das neurotrofinas, dessa forma afetando na sobrevivência neuronal [2, 3, 4]. Podendo atuar como fármacos para patologias neurodegenerativas [5]. Outros ainda demonstraram o efeito neuroprotetor do pré-tratamento com GM1 intraperitoneal ou injeção intraocular de GM1 após a lesão. Resultados anteriores mostraram um elevado índice de morte dos animais após cirurgia, e o desenvolvimento deste trabalho teve por objetivo testar se há efeito do GM1 na morte de ratos após cirurgias de ablação de colículo superior em comparação com o o mesmo procedimento utilizando-se salina.

Material e métodos

Os experimentos foram feitos utilizando-se ratos recém nascidos da variedade *Lister Hooded*, submetidos à cirurgia para ablação de colículo superior, com período de sobrevivência de 24 horas. A lesão do colículo superior foi feita a partir da aspiração do tecido em P1. Os animais foram anestesiados por hipotermia e submetidos a cirurgia, onde o animal sofre uma incisão na pele e musculatura da cabeça, abre-se a caixa craniana expondo os colículos superiores, que nesta idade ainda não estão recobertos pelos hemisférios cerebrais. Com uma pequena seringa

hipodérmica acoplada a uma bomba de vácuo, então aspiramos delicadamente esta região do cérebro. A cartilagem é recolocada no local e a pele é colada com cola “super bonder”. O animal é então colocado em um recipiente e levado ao banho-maria à 37°C, onde permanece até recuperar sua temperatura e coloração normais. Os experimentos foram realizados utilizando-se 8 filhotes de cada ninhada, divididos em três grupos, sendo 2 animais do grupo salina, 3 animais do grupo GM1 40ng/mL, e 3 animais do grupo GM1 4μg/L para cada repetição. Foram realizados 6 experimentos totalizando 48 animais.

Após o término da cirurgia os animais receberam administração intraperitoneal de 20μL de salina (n=12) ou de GM1(40ng/L, n=18 a 4μg/L, n=18). Foi quantificado o número de animais que sobreviveram às 24 horas pós cirúrgicas. Os resultados representam as médias das porcentagens de animais submetidos à experimentação que sobreviveram ao protocolo experimental após 24 horas $\pm$ o desvio padrão da média. Para as comparações estatísticas foi utilizada a análise de variância (ANOVA). As diferenças entre as médias foram avaliadas com valor p corrigido para Bonferroni, adotado como critério de significância $p \leq 0.05$. Após a quantificação os animais foram sacrificados por decaptação e as retinas foram retiradas para posterior análise.

Resultados e discussão

Os resultados mostram que o índice de mortalidade dos animais tratados com GM1 é de 50,53 $\pm$ 29 e o índice de mortalidade dos animais tratados com salina é de 34,30 $\pm$ 40,2 (Fig. 1). Portanto, não existe diferença significativa entre o índice de mortalidade dos animais tratados com GM1 comparado ao dos animais tratados com salina.

Em seguida, analisamos duas concentrações diferentes de GM1, 40ng/ml e 4μl/ml. Os resultados mostraram que animais tratados com GM1 40ng/ml tiveram um índice de morte médio de 56,55 $\pm$ 34,24, os tratados com GM1 4μl/ml tiveram índice de morte médio de 40,48 $\pm$ 31,79 e os tratados com salina 34,55 $\pm$ 43,85 (Fig. 2). Portanto, independente da dose de GM1 administrada, os ratos não apresentaram índice significativamente diferente dos índices apresentados pelos animais tratados com salina.

Estes resultados são importantes, pois serão

1. Acadêmica de Ciências Biológicas. Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

2. Bióloga. Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

3. Professor adjunto. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Rua Universitária, 2069, Jardim Universitário, 85814-110, Cascavel, Paraná, Brasil.

*Autor para contato: E-mail: nakatani@unioeste.br

utilizados como subsídio para os experimentos posteriores, onde testaremos diferentes tratamentos utilizando GM1 para impedir a morte neuronal em indivíduos submetidos a cirurgias do sistema nervoso central.

Os resultados apresentados neste trabalho sugerem que o monossialogangliosídeo GM1 aplicado exógenamente não aumenta a morte de ratos neonatos após ablação de colículo quando comparado à morte após aplicação de salina.

Agradecimentos

À Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE) pela disponibilização de materiais e laboratórios que possibilitaram a realização desta pesquisa.

Referências

- [1] RABIN, S.J.; MOCCHETTI, I. 1995. GM1 ganglioside activates the high-affinity nerve growth factor receptor TrkA. *Journal of neurochemistry* 65: 347-354.
- [2] CHOI, J.S.; KIM, J.; JOO, C.K. 2003. Activation of MAPK and CREB by GM1 induces survival of RGCs in the retina with axotomized nerve. *Investigative ophthalmology and visual science* 44: 1747-1752.
- [3] SKAPER, S.D.; LEONS, A.; TOFFANO, G. 1989. Ganglioside function in the development and repair of the nervous system. *Molecular Neurobiology* 3: 173-199.
- [4] LEDEEN, R.W.; WU, G.; CANELLA, M.S.; ODERFELD-NOWAK, B.; CUELLO, A.C. 1990. Gangliosides as neurotrophic agents: studies on the mechanism of action. *Acta Neurobiology* 50: 439-449.
- [5] FUSCO, M.; VANTINI, G.; SCHIAVO, N.; ZANOTTI, A.; FACCI, L.; SKAPER, S.D. 1993. Gangliosides and neurotrophic factors in neurodegenerative diseases: from experimental findings to clinical perspectives. *Annals of the New York Academy of Sciences* 695: 314-317.

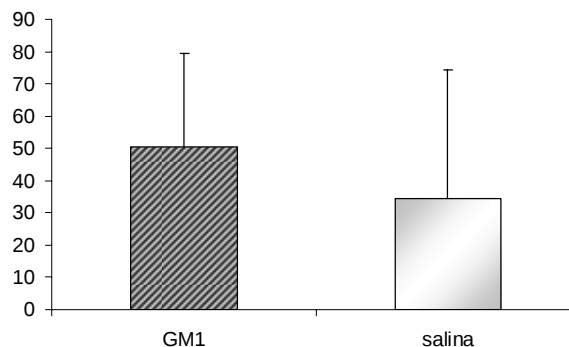


Figura 1. Porcentagem de morte de ratos com ablação de colículo, tratados com GM1 ou salina.

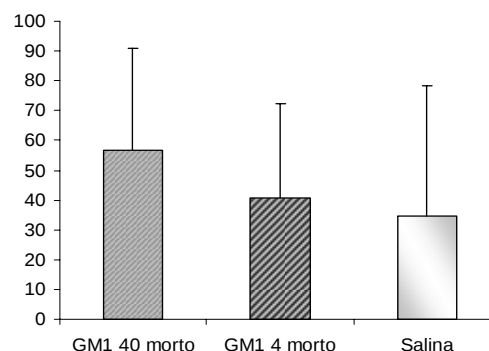


Figura 2. Porcentagem de morte de ratos neonatos submetidos a diferentes tratamentos, 24 horas após ablação de colículo superior