

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA *PROF. TUISKON DICK*
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA

**AÇÃO NEUROPROTETORA DOS POLIFENÓIS RESVERATROL
E DAIDZEÍNA E A EXPRESSÃO DO GANGLIOSÍDIO GM1 EM UM
MODELO DE CULTURA ORGANOTÍPICA DE HIPOCAMPO DE
RATO SUBMETIDO À PRIVAÇÃO DE OXIGÊNIO-GLICOSE**

ANA CAROLINA BREIER

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Biológicas: Bioquímica como requisito parcial à
obtenção do título de Mestre

Porto Alegre, Junho de 2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA *PROF. TUISKON DICK*
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA

**AÇÃO NEUROPROTETORA DOS POLIFENÓIS RESVERATROL
E DAIDZEÍNA E A EXPRESSÃO DO GANGLIOSÍDIO GM1EM UM
MODELO DE CULTURA ORGANOTÍPICA DE HIPOCAMPO DE
RATO SUBMETIDO À PRIVAÇÃO DE OXIGÊNIO-GLICOSE**

ANA CAROLINA BREIER

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Vera Maria Treis Trindade
Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Christianne Gazzana Salbego

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Biológicas: Bioquímica como requisito parcial à
obtenção do título de Mestre.

Banca examinadora:
Prof.a Dra. Carla Dalmaz (UFRGS) - relatora
Prof.a Dra. Angela T. S. Wyse (UFRGS)
Prof.a Dra. Márcia Rosângela Wink (UFCSPA)

Porto Alegre, Junho de 2010

AGRADECIMENTOS

À professora Vera M. T. Trindade pela oportunidade de orientação, dedicação e amizade durante a realização deste trabalho;

À professora Christianne Salbego por todo incentivo na realização das culturas organotípicas;

À professora Fátima Guma e a Letícia Petenuzzo, pelo interesse e ajuda com as imagens de microscopia confocal;

Ao Rudimar pela prontidão em ajudar na realização das culturas;

Aos colegas de bioquímica dos laboratórios 25, 21 e 23, presentes durante todas as etapas de realização do mestrado;

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica, em especial à Cléia da secretaria e ao pessoal do atário;

À minha família, pai, irmãos e amigos, pela compreensão e apoio nas minhas escolhas, e em especial, a minha mãe, excelente professora de biologia, responsável pela minha escolha na carreira científica;

À UFRGS e ao apoio financeiro do CNPq, IBNET e PRONEX-FAPERGS.

RESUMO

Os gangliosídeos são glicoesfingolipídios caracterizados pela presença de ácido siálico em sua estrutura química e por suas altas concentrações nas membranas das células do sistema nervoso, além de desempenharem importantes funções celulares, como diferenciação, comunicação, maturação, plasticidade neuronal, entre outras. A isquemia cerebral está entre as principais causas de mortalidade e morbidade em todo o mundo, o que torna essa patologia alvo de muitos estudos para o entendimento dos mecanismos desencadeados que levam à morte neuronal, e ao mesmo tempo, com o objetivo de descobrir novos tratamentos farmacológicos. Neste estudo investigamos a ação neuroprotetora dos polifenóis resveratrol e daidzeína associando-a ao efeito destas substâncias sobre o perfil cromatográfico dos gangliosídeos. Para isso, foi utilizado um modelo *in vitro* de privação de oxigênio-glicose (POG) em culturas organotípicas de hipocampo de rato. Nossos resultados demonstraram que o tratamento com ambos os polifenóis diminuiu significativamente a morte celular induzida pela POG. Através da análise do perfil cromatográfico dos gangliosídeos, podemos observar uma diminuição de expressão para o gangliosídeo GM1 no grupo POG, o que não aconteceu nos grupos POG tratados com os polifenóis. Além disso, os resultados de imuno-histoquímica analisados por microscopia confocal, permitiram visualizar uma maior fluorescência de GM1 localizada na região dos neurônios hipocampais, marcados pela proteína NeuN. Portanto, esses resultados sugerem que a ação neuroprotetora dos polifenóis possa ocorrer através da expressão do gangliosídeo GM1 em neurônios hipocampais, prevenindo desta forma, a morte celular.

ABSTRACT

The gangliosides are glycosphingolipids characterized by the presence of sialic acid in their chemical structure and by their high concentrations in the nervous system cell membranes. Besides this, they have important cellular functions such as differentiation, communication, maturation, neuronal plasticity among others. Cerebral ischemia is one of the main causes of morbidity and mortality worldwide, making this disease the subject of many studies to understand the mechanisms that trigger the neuronal death. At the same time, the discovery of drugs that target these mechanisms could lead to new pharmacological treatments. We investigated the neuroprotective action of the polyphenols resveratrol and daidzein associating it to their effect on the chromatographic profile of gangliosides. For this, we used an *in vitro* model of oxygen-glucose deprivation (OGD) in organotypic cultures of rat hippocampus. Our results demonstrated that treatment with both polyphenols significantly decreased cell death induced by OGD. Through analysis of the chromatographic gangliosides profile, a decrease of GM1 ganglioside expression in OGD group was observed, which did not happen in the OGD groups treated with polyphenols. Furthermore, immunohistochemistry analysis by confocal microscopy, showed a greater GM1 fluorescence located in the region of hippocampal neurons, marked by NeuN protein. These results suggest that the polyphenols neuroprotective action may occur at the level of GM1 ganglioside expression in hippocampal neurons and may prevent cellular death.

ABREVIATURAS

Akt: Proteína cinase B

AMPA: Ácido alfa-amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazolepropriônico

AVC: Acidente Vascular Cerebral

BDNF: Fator neurotrófico derivado do cérebro

CA: *Corno de Ammon*

CAT: Catalase

DG: Giro denteado

DMSO: Dimetilsulfóxido

ERK1/2: Proteína cinase regulada por sinais extracelulares 1 e 2

FDA: *Food and Drug Administration*

GSH-Px: Glutaciona peroxidase

GSH-Rd: Glutaciona redutase

GSK-3 β : Glicogênio sintase cinase-3 beta

IL-1 β : Interleucina 1 beta

IL-6: Interleucina 6

IP: Iodeto de propídeo

LDH: Lactato desidrogenase

MAPK: Proteína cinase ativada por mitógeno

NeuN: Proteína nuclear específica de neurônios

NF κ B: Fator nuclear kappa B

NGF: Fator de crescimento do nervo

NMDA: N-metil-D-aspartato

NT3: Neurotrofina 3

PI3-K: Fosfoinositol-3 cinase

POG: Privação de Oxigênio e Glicose

RE: Receptor estrogênico

SNC: Sistema Nervoso Central

SOD: Superóxido dismutase

TNF α : Fator de necrose tumoral *alpha*

tPA: Ativador plasminogênio tecidual

TrkC: Receptor tirosina cinase C

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

- Figura 1:** Principais eventos desencadeados pela isquemia que levam ao dano cerebral..... 11
- Figura 2:** Estrutura química representativa dos gangliosídeos..... 15
- Figura 3:** Biossíntese das séries *o*, *a*, *b*, e *c* de gangliosídeos..... 17
- Figura 4:** Estrutura química das principais isoflavonas encontradas na soja evidenciando suas similaridades estruturais com 17 β -estradiol..... 19
- Figura 5:** Estrutura química do *cis* e *trans*-resveratrol..... 23

RESULTADOS

Artigo Científico

- Figure 1:** Effect of resveratrol and daidzein on cell damage induced by OGD for 60 min in organotypic hippocampal cultures47
- Figure 2:** Quantification of total ganglioside radiolabeling (measured as cpm/ μ g protein) obtained from organotypic hippocampal slice cultures exposed on OGD and treated with resveratrol or daidzein..... 48
- Figure 3:** High performance thin layer-autoradiography of D-[1-C¹⁴] galactose labeled endogenous gangliosides from organotypic hippocampal slice cultures exposed on OGD and treated with resveratrol or daidzein48
- Figure 4:** Double immunofluorescence staining of GM1 (green) and NeuN (red) in organotypic hippocampal slice cultures exposed on OGD and treated with resveratrol or daidzein49

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
1.1. As doenças neurodegenerativas	8
1.2. A isquemia cerebral	8
1.2.1. Eventos envolvidos na morte celular após a isquemia	10
1.2.2. Vulnerabilidade seletiva do hipocampo	12
1.2.3. Modelo experimental <i>in vitro</i> : Cultura organotípica	13
1.3. Gangliosídeos	14
1.3.1. Gangliosídeos e a isquemia cerebral	16
1.4. Compostos polifenólicos	18
1.4.1. As isoflavonas da soja	18
1.4.2. O Resveratrol	22
2. OBJETIVOS	25
3. RESULTADOS	26
4. DISCUSSÃO	51
5. CONCLUSÕES	59
6. PERSPECTIVAS	60
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
8. ANEXO	78

1. INTRODUÇÃO

1.1. DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS

As doenças neurodegenerativas são caracterizadas por uma perda seletiva e progressiva de uma população de neurônios específica que, por sua vez, determina as formas de apresentação clínica, conhecidas por problemas que envolvem a memória, a cognição, a linguagem e a personalidade (Dickson, 2010). Dentre essas doenças do Sistema Nervoso Central (SNC), podemos destacar os distúrbios cerebrovasculares, a epilepsia, a doença de Alzheimer, a doença de Parkinson e a esclerose múltipla. Em conjunto, essas doenças afetam uma grande parcela da população e, na maioria dos casos, levam à incapacidade física e/ou mental (Price, 1999).

As pesquisas sobre os distúrbios do SNC têm por objetivo determinar os aspectos moleculares e genéticos da vulnerabilidade seletiva e os mecanismos celulares da perda neuronal progressiva, através de modelos experimentais. Estes modelos são, também, úteis para o esclarecimento das mudanças bioquímicas durante o processo de degeneração. De uma maneira geral, as linhas de pesquisa neste campo visam identificar novos alvos terapêuticos e tratamentos que possam ser testados em modelos experimentais e, posteriormente, em pacientes (Price, 1999; Dickson, 2010).

1.2. ISQUEMIA CEREBRAL

A isquemia cerebral é definida como uma redução grave ou um bloqueio completo de fluxo sanguíneo para o cérebro (Schmidt-Kastner e Freund, 1991). Entre as denominações conhecidas, o acidente vascular cerebral (AVC) é um termo clínico popularmente utilizado para descrever sintomas neurológicos causados por um bloqueio parcial ou completo do fluxo sanguíneo ou por uma hemorragia no cérebro. Desta forma ocorre um dano súbito e, muitas vezes, permanente, no tecido cerebral irrigado pelos vasos sanguíneos afetados (Price, 1999). O tipo mais

freqüente de isquemia em humanos é a isquemia focal, que é definida como uma interrupção do fluxo sanguíneo para uma parte do cérebro. Outro tipo é a isquemia global, que resulta da interrupção transitória do fluxo sanguíneo para todo o cérebro, como ocorre durante uma parada cardíaca (Lipton, 1999).

O AVC é a segunda causa de morte mais comum e a que mais leva à invalidez em todo o mundo. Por ano, cerca de 795 mil norte-americanos sofrem um novo AVC, dos quais 137 mil morrem, sendo que a estimativa de gastos com essa doença para 2010 será em torno de 73,7 bilhões de dólares para os Estados Unidos, incluindo custos médicos e os cuidados de indivíduos com invalidez relacionada ao AVC (Donnan *et al.*, 2008; American Stroke Association, 2010). No Brasil, dados do Ministério da Saúde mostram que em 2005 as doenças cerebrovasculares foram a principal causa de morte no país, com mais de 90 mil obtidos, correspondendo a 10% da mortalidade no país (Ministério da Saúde, 2008).

Os AVCs podem ser classificados em dois tipos:

- O AVC isquêmico: corresponde cerca de 87% dos casos. Ocorre como resultado da obstrução de um vaso sanguíneo que transporta sangue a uma região do cérebro, ocasionada pela formação de depósitos de gordura na parede dos vasos. Tal obstrução pode ser trombótica quando acontece por uma placa de gordura que se desenvolve no próprio vaso, ou ainda embólico, quando uma placa formada em um vaso desprende-se e é carregada a um vaso de menor calibre.

- AVC hemorrágico: de menor prevalência, ocorre quando um vaso rompe-se e libera o sangue, que se acumula e comprime o tecido cerebral ao redor. Dois tipos de distúrbios dos vasos sanguíneos podem causar uma hemorragia: o aneurisma, que é a uma dilatação anormal de uma artéria cerebral, ou uma malformação arteriovenosa, um grupo de vasos sanguíneos anormalmente formados que também podem romper-se (American Stroke Association, 2010).

As manifestações variam conforme a região cerebral envolvida, mas alguns sintomas são frequentemente encontrados, como a paralisia de um lado do corpo, problemas de visão e de fala, perda de memória, alteração de consciência, confusão ou vertigem (American Stroke Association, 2010). Entre os fatores de risco para o AVC estão o sexo masculino, a raça negra, doenças cardíacas, história familiar de doença vascular, fibrilação atrial, idade avançada, hipertensão, hiperlipidemia,

diabetes *mellitus*, sedentarismo, obesidade, alcoolismo, tabagismo e o uso de anticoncepcionais (Michael e Shaughnessy, 2006).

O diagnóstico é realizado através da sintomatologia e da história clínica com confirmação por exames de imagem e testes de fluxo sanguíneo. Apesar dos constantes esforços, os tratamentos existentes contra o AVC isquêmico até o momento não são eficazes. Atualmente é utilizado com aprovação pelo *Food and Drug Administration* (FDA) a terapia trombolítica, com administração de alteplase ou tPA (ativador do plasminogênio tecidual), que tem por objetivo lisar o coágulo que está obstruindo a artéria cerebral, recuperando a circulação no local da isquemia. Essa administração deve ser feita em até 3 horas após a isquemia para ser eficaz. Além disso, são utilizados como medida profilática em indivíduos com fatores de risco para AVC agentes antiplaquetário, como a aspirina, e também anticoagulantes, como a warfarina (Donnan *et al.*, 2008; American Stroke Association, 2010).

1.2.1. Eventos envolvidos na morte celular após a isquemia

O metabolismo energético normal no cérebro tem algumas características especiais, que incluem uma taxa metabólica alta, estoques de carboidratos limitados e uma alta dependência do metabolismo aeróbico de glicose. Por essa razão, ele é mais vulnerável a uma diminuição nas concentrações de oxigênio e glicose do que outros tecidos. Além disso, o cérebro possui uma capacidade limitada de reparo de determinados danos, fazendo com que as mudanças mínimas na disponibilidade de oxigênio e de glicose a esse órgão possam provocar danos irreversíveis (Lipton, 1999).

Depois da diminuição do fluxo sanguíneo em uma região cerebral, a cascata isquêmica é rapidamente iniciada em questão de segundos, e essa é composta de eventos bioquímicos que levam à desintegração das membranas celulares e à morte neuronal no centro da região afetada. A isquemia cerebral se inicia com uma grave hipoperfusão focal, que leva aos eventos de excitotoxicidade e estresse oxidativo, que, por sua vez, causam lesão microvascular, disfunção na barreira hematoencefálica e início de um processo inflamatório, esquematizado na Figura 1. Fatores

como o grau e a duração da isquemia, assim como a capacidade do cérebro para se auto-reparar, determinam a extensão do dano cerebral (Lakhan *et al.*, 2009).

Evento isquêmico

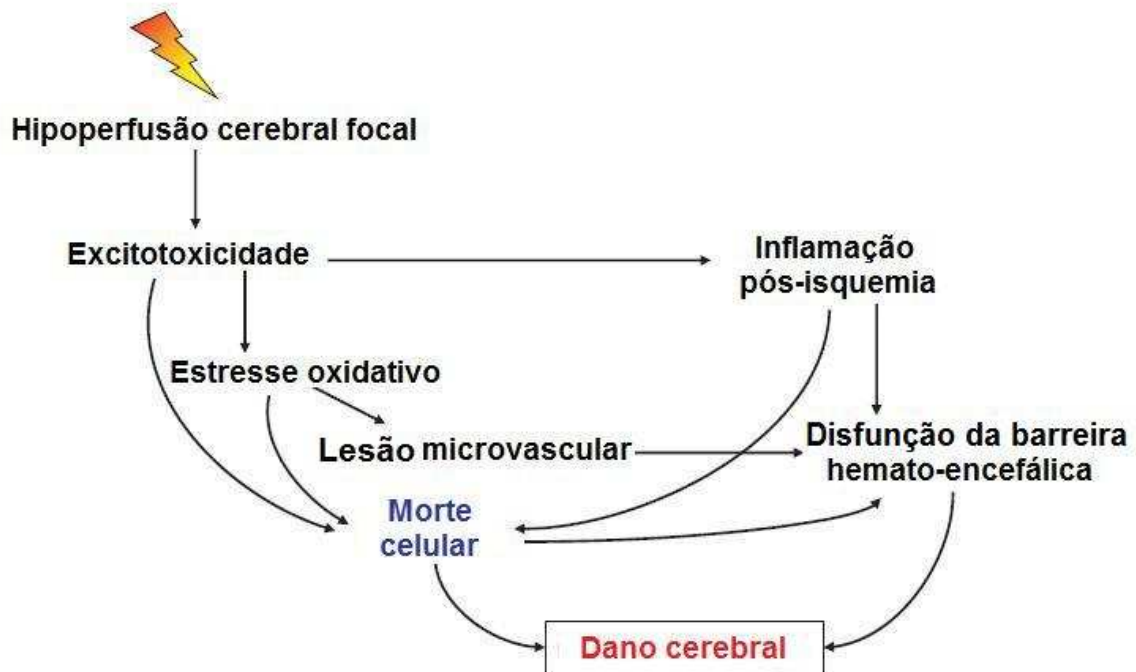


Figura 1. Principais eventos desencadeados pela isquemia que levam ao dano cerebral (Adaptado de Lakhan *et al.*, 2009).

Na região central da lesão isquêmica, as células passam por uma despolarização axônica e não voltam a ser repolarizadas. Enquanto na região da penumbra, as células podem ser repolarizadas à custa de um maior consumo de energia, e então, despolarizadas novamente, em resposta a níveis elevados de glutamato e íons potássio no espaço extracelular. Essas repetitivas despolarizações recebem o nome de “despolarizações peri-infarto” e resultam no dano celular excitotóxico (Lakhan *et al.*, 2009). Bioquimicamente, a cascata de eventos neuroquímicos inclui também, a disfunção na bomba NA/K, acidose láctica, aumento do cálcio intracelular pela abertura de canais de cálcio voltagem-dependentes, ativação de receptores AMPA e NMDA, ativação da enzima óxido nítrico sintase, formação de espécies reativas de oxigênio/nitrogênio, peroxidação lipídica, liberação de diversas citocinas pro-inflamatórias, tais como TNF α , IL-6 e IL-1 β (Lo *et al.*; 2003).

Quando o fluxo sanguíneo é restaurado após a isquemia, este processo de reperfusão é crítico para o tecido cerebral na restauração das funções normais, mas paradoxalmente pode resultar em dano secundário, responsável por uma grave lesão, tanto quanto a isquemia por si só, aumentando ainda mais a morte neuronal (Lakhan *et al.*, 2009).

O conhecimento dos eventos moleculares associados à morte celular causada pela isquemia, bem como daqueles envolvidos nas estratégias celulares de sobrevivência a estímulos, nocivos, são fundamentais para o desenvolvimento de agentes neuroprotetores e terapias que bloqueiem o metabolismo celular que ocorre durante a lesão isquêmica (Lakhan *et al.*, 2009).

1.2.2. Vulnerabilidade seletiva do hipocampo

No cérebro, populações de células que se encontram próximas podem apresentar uma vulnerabilidade diferente frente à isquemia. Atualmente, mesmo com os conhecimentos sobre a anatomia, a fisiologia e a bioquímica do SNC, ainda resta muito a descobrir sobre as causas dessa vulnerabilidade diferenciada de populações específicas em resposta a esse tipo de lesão (Schreiber e Baudry, 1995).

No hipocampo, as células piramidais da região CA1 são sensíveis, enquanto as células piramidais da região adjacente CA3 são resistentes. No giro denteado (DG), as células granulares são resistentes, enquanto no hilo somente uma sub-população de células parece ser vulnerável (Hsu *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 2000). Após 20-30 minutos de isquemia *in vivo* no rato, as áreas CA1, CA2 e o hilo são afetadas, enquanto as células das regiões CA3 e DG permanecem aparentemente normais. Os neurônios da região CA1 e do hilo são, talvez, os mais vulneráveis de todo o cérebro. Resumindo, a vulnerabilidade do hipocampo à isquemia segue a ordem: CA1>hilo>CA2>CA3>DG. É importante ressaltar que, apesar de os neurônios morrerem depois da lesão, as células astrogliais e vasculares sobrevivem, garantindo a resposta plástica do cérebro (Schmidt-Kastner e Freund, 1991). Essa morte diferencial já foi demonstrada tanto *in vitro* (Cimarosti *et al.*, 2001, Valentim *et al.*, 2003; Horn *et al.*, 2005) quanto *in vivo* (Valentim *et al.*, 2001).

1.2.3. Modelo experimental de *in vitro*: Cultura organotípica

Como modelo para o estudo da isquemia cerebral, uma alternativa para a experimentação animal *in vivo*, pode ser o uso de sistemas *in vitro*, através de cultivo de tecidos, como por exemplo, as culturas organotípicas de hipocampo de ratos expostas à privação de oxigênio e glicose (Pringle *et al.*, 1997).

O modelo de cultura organotípica foi desenvolvido em 1981 por Gähwiler e modificado por Stoppini e colaboradores (1991). Basicamente trata-se de um método que mantém as fatias de um determinado tecido em cultivo, na interface entre o ar e o meio de cultivo, podendo permanecer por diversas semanas. Uma das principais características destas culturas é a de manter a organização do tecido como ela ocorre *in vivo*. Isso significa que todos os tipos celulares estão presentes e organizados da mesma forma que estariam *in vivo*, sendo essa uma grande vantagem dessa cultura sobre a cultura primária de tipos celulares específicos (Gähwiler, 1981; Stoppini *et al.*, 1991).

A cultura organotípica de hipocampo pode ser submetida a um modelo experimental que reproduz as condições de isquemia *in vivo*, o qual é chamado de privação de oxigênio e glicose (POG). Esse modelo consiste em expor as culturas a um meio sem glicose e a uma atmosfera saturada de nitrogênio. Essas condições simulam a interrupção do fluxo sanguíneo da isquemia e suas conseqüências, tais como a morte neuronal e a vulnerabilidade seletiva (Laake *et al.*, 1999).

O grupo de pesquisa em Neuroproteção e Sinalização Celular sob a orientação da Dra. Christianne Salbego tem publicado diversos estudos que demonstram a ação neuroprotetora de drogas em um protocolo de cultura organotípica de fatias de hipocampo de ratos submetidas à POG. Entre essas substâncias estão, o ebselen (Porciúncula *et al.*, 2003), o disseleneto de difenila (Ghisleni *et al.*, 2003), a infusão alcoólica de *Ptychopetalum olacoides* Bentham (Olacaceae) (Siqueira *et al.*, 2004 a), o estradiol (Cimarosti *et al.*, 2005 a; b; 2006), o resveratrol (Zamin *et al.*, 2006); o lítio e valproato (Wilot *et al.*, 2007); a guanosina (Thomasi *et al.*, 2008); a boldina (Konrath *et al.*, 2008) e oxcarbazepina (Simão *et al.*, 2009).

Além disso, o protocolo de cultura organotípica também é utilizado para investigação de alguns fatores como envelhecimento (Siqueira *et al.*, 2004 b),

exercício (Scopel *et al.*, 2006; Cechetti *et al.*, 2007), estresse (Fontella *et al.*, 2005) e aminoacidemias (Tagliari *et al.*, 2006 a; b) frente à POG. O modelo é ainda utilizado para estudar os mecanismos celulares e bioquímicos em outras patologias, como, a Doença de Alzheimer (Nassif *et al.*, 2007; Frozza *et al.*, 2009; Hoppe *et al.*, 2010).

1.3. GANGLIOSÍDIOS

Os gangliosídeos são glicoesfingolípídios complexos que possuem um ou mais resíduos de ácido siálico em sua estrutura, sendo o ácido N-acetilneuramínico o mais abundante. Os resíduos de ácido siálico se encontram unidos a oligossacarídeos neutros através de ligações α -glicosídicas, sendo que esses resíduos de açúcares neutros podem ser: glicose, galactose, N-acetilglicosamina, N-acetilgalactosamina e a fucose, que em diferentes combinações conferem heterogeneidade aos diferentes tipos de gangliosídeos (Svennerholm, 1994; Maccioni *et al.*, 2002).

A nomenclatura comumente utilizada foi proposta por Svennerholm (1956; 1963) e se baseia no número de ácidos siálicos presentes na molécula e na sua mobilidade cromatográfica, correspondente à complexidade estrutural dos gangliosídeos. Segundo esta classificação, os gangliosídeos são designados pela letra G maiúscula, seguida pelas letras também maiúsculas: M (monossialo-), D (dissialo-), T (trissialo-), Q (tetrassialo-), P (pentassialo-), H (hexassialo-) ou S (heptassialo-) para designar a presença de um a sete resíduos de ácido siálico, respectivamente, e mais um número e/ou letra minúscula para distinguir os diferentes membros de cada grupo (Figura 2).

Os gangliosídeos são encontrados em altas concentrações na camada externa da membrana plasmática, principalmente nas células neurais (Maccioni *et al.*, 2002) onde representam cerca de 10 a 12% do conteúdo total de lipídios (Ledeen, 1978). A distribuição destes ocorre de uma forma assimétrica ao longo da superfície 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, sujeitos assim, a interações com moléculas sinalizadoras extracelulares (Tettamanti e Riboni, 1993).

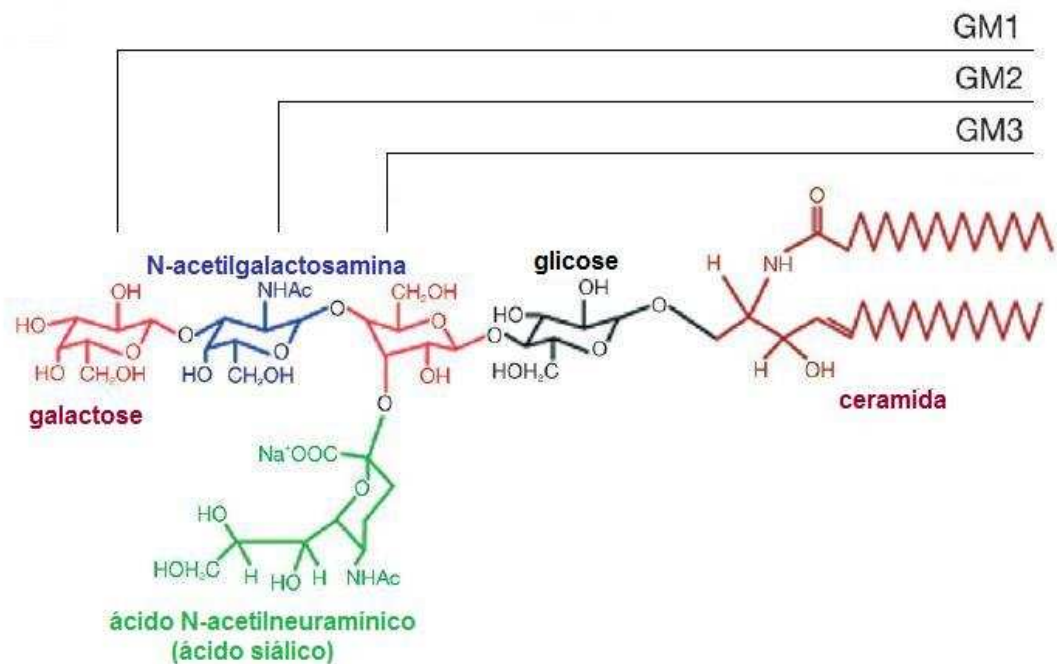


Figura 2. Estrutura química representativa dos gangliosídios: GM3, GM2 e GM1 (Adaptado de Mocchetti, 2005).

Diversos estudos sugerem a formação de microdomínios de membrana enriquecidos em glicoesfingolípídios, em particular os gangliosídios, e colesterol, conhecidos por *rafts* de membrana. Essas formas de organização destes lipídios em membranas são estruturas transientes e altamente dinâmicas, sendo a capacidade de incluir ou excluir determinadas proteínas, uma das características mais importantes atribuídas aos *rafts* e, conseqüentemente, o desencadeamento de eventos moleculares ou não (Simons e Ikonen, 1997; Pike, 2006).

A biossíntese dos gangliosídios é um processo compartimentalizado, que ocorre, inicialmente, no retículo endoplasmático com a síntese da ceramida precursora. As etapas seguintes prosseguem nas membranas do Golgi onde, a partir dos nucleotídios doadores correspondentes, são adicionados, sequencialmente, os resíduos de oses à cadeia oligossacarídica em formação (Tettamanti, 2004). Este processo apresenta quatro rotas denominadas de série “o”, série “a”, série “b” e série “c” (Figura 3). A síntese dos gangliosídios é estreitamente regulada pelas atividades das enzimas glicosiltransferases, as quais apresentam modulação no nível de transcrição gênica e modificações pós-traducionais referentes à fosforilação ou à N-glicosilação da proteína e referentes à modulação do seu tráfego intra-celular (Yu *et al.*, 2004). Estudos farmacológicos revelaram que os gangliosídios simples (GM3,

GD3) são sintetizados em todos os compartimentos do Golgi, enquanto os gangliosídeos complexos (GM1, GD1a, GD1b e GT1b) são formados na trans-Golgi e no trans-Golgi-*network* (Maccioni *et al.*, 2002).

O transporte dos gangliosídeos recém sintetizados até a membrana plasmática é feito através de vesículas por um fluxo exocítico, um processo de tráfego intracelular compartilhado com proteínas, regulado para a adequada distribuição lipídica e protéica na membrana e demais organelas. A degradação de gangliosídeos, por sua vez, ocorre através do fluxo endocítico, na via de degradação endossomal-lisossomal, em compartimentos acídicos pela ação seqüencial de hidrolases específicas (Tettamanti *et al.*, 2004).

O fluxo metabólico de gangliosídeos é então um processo dependente da combinação das enzimas de síntese/degradação e modulação de suas atividades, do fluxo nas vias exo e endocíticas associadas ao metabolismo celular e da taxa de *turnover* de membrana, associada ao status de proliferação celular (Tettamanti, 2004).

1.3.1. Gangliosídeos e isquemia cerebral

O fato de existir uma alta concentração de gangliosídeos no tecido nervoso em comparação a outros tecidos sugere que eles sirvam a um propósito específico neste tecido (Leeden, 1978). Muitos estudos evidenciam a participação dos gangliosídeos no desenvolvimento neuronal, na sinaptogênese e transmissão sináptica, e se acredita que exerçam papel biológico por dois mecanismos: atuando como receptores, podendo interagir com outras células, com a matriz extracelular ou com substâncias exógenas e atuando como moduladores de proteínas funcionais de membrana, tais como receptores de fatores tróficos e transportadores. Dentre as ações endógenas propostas para os gangliosídeos foram sugeridas a sua participação em processos de crescimento, reconhecimento e diferenciação celular (Hakomori 1981, 1990). Aumentos significativos no conteúdo dos principais gangliosídeos durante alguns estágios da diferenciação neuronal sugerem uma necessidade funcional dessas substâncias nos processos de neuritogênese e sinaptogênese (Yu *et al.*; 2009).



Figura 3. Biossíntese das séries o, a, b, e c de gangliosídeos. (Adaptado de Maccioni *et al.*, 1999).

Estudos do nosso grupo de pesquisa mostraram que o perfil cromatográfico dos diferentes gangliosídeos presentes no hipocampo de ratos submetidos à injúria da hipóxia-isquemia neonatal foi mantido em relação ao grupo controle, entretanto ocorreu uma redução quantitativa no conteúdo total dos mesmos, assim como, em outros lipídios de membrana, os fosfolipídios e o colesterol (Ramirez *et al.*, 2003). Além disso, Trindade e colaboradores (2001) descreveram alterações na biossíntese dos gangliosídeos em hipocampus de ratos submetidos à hipóxia-isquemia neonatal. As atividades enzimáticas para GD3 e GM2 sintase apresentaram uma diminuição, o que pode explicar o acúmulo de GM3 encontrado neste trabalho.

Os efeitos da isquemia sobre a expressão de gangliosídeos em córtex cerebral também evidenciou diferenças no perfil cromatográfico. O aumento de GM3 e de GM1 foi demonstrado, sugerido a estes, papéis de moduladores na cascata do processo isquêmico em córtex (Kwak *et al.*, 2005). De fato, o GM3 é estruturalmente simples e precursor dos demais gangliosídeos, e o seu acúmulo mostra-se transiente

e tende a voltar ao seu conteúdo normal algumas horas após ocorrido o dano isquêmico (Barrier *et al.*, 2005; Kwal *et al.*, 2005). Por outro lado, o GM1 é reportado por seu efeito neuroprotetor e, conseqüentemente, sua síntese *in vivo* em processos de lesão como a isquêmica pode explicar a manutenção da integridade neuronal (Biraboneye *et al.*, 2009).

1.4. COMPOSTOS POLIFENÓLICOS

Os polifenóis constituem uma classe de produtos fenólicos presentes na natureza e estão disponíveis em frutas, vegetais, sementes, flores e cascas. Estes componentes bioativos nos vegetais são subdivididos em classes de acordo com a estrutura química de cada substância. Entre os principais grupos de polifenóis encontram-se os estilbenos, como o resveratrol presente nas uvas e vinho, e os flavonóides, um grupo particularmente muito grande e muito estudado, possuindo mais de 5.000 compostos identificados, entre os quais podemos citar as isoflavonas da soja. Nos últimos anos as investigações destes compostos em benefícios da saúde mostram que as ações fisiológicas exercidas pelos polifenóis são muitas. Suas propriedades já foram relacionadas à prevenção de doenças cardiovasculares, neurodegenerativas, câncer, entre outras, principalmente em função da elevada capacidade antioxidante (Faller e Fialho, 2009).

1.4.1. Isoflavonas da soja

O Brasil é o segundo maior exportador de grãos de soja (*Glycine max* L.) e o principal exportador de farelo de soja, com 32% do mercado mundial, o que representa 75% da produção brasileira. Países orientais, como Japão e China, já utilizam há muitos anos a soja fermentada na alimentação e, atualmente, tem se percebido um crescente consumo desta leguminosa e de seus derivados em países europeus e nos Estados Unidos como um alimento funcional, isto é, que possui substâncias biologicamente ativas que produzem benefícios à saúde. Estima-se que

a produção destes alimentos possa chegar, no ano de 2010, à cifra de quase 60 bilhões de dólares (Park *et al.*, 2001).

A soja tem sido utilizada há muito tempo como alimento devido ao seu elevado teor protéico. Entretanto, também possui na sua composição química, compostos polifenólicos, as isoflavonas, que exercem importantes propriedades biológicas, tais como atividade antioxidante (Yousef *et al.*, 2004; Liang *et al.*; 2008); propriedades estrogênicas (Belcher e Zsarnovszky, 2001), atividade anticancerígena (câncer de mama e próstata) (Barnes *et al.*, 1996; Denis *et al.*, 1999) e efeito neuroprotetor e neurotrófico (Zhao *et al.*, 2002).

As isoflavonas são consideradas fitoestrógenos comuns, encontrados em abundância nos grãos de soja e seus derivados. A denominação fitoestrógenos é dada para as moléculas provenientes de plantas que possuem estrutura química semelhante aos estrógenos endógenos e que possa diretamente se ligar a receptores estrogênicos (RE) (Zhao *et al.*, 2002). Daidzeína, genisteína e gliciteína são as isoflavonas presentes em maior proporção na soja (Figura 4), ocorrendo também na forma de glicosídeos, denominados daidzina, genistina e glicitina, respectivamente, porém estas glicosil isoflavonas possuem menor atividade biológica que suas formas agliconas (Park *et al.*, 2001). Neste trabalho, a isoflavona em estudo foi a daidzeína.



Figura 4. Estrutura química das principais isoflavonas encontradas na soja evidenciando suas similaridades estruturais com 17β-estradiol.

A afinidade dos fitoestrógenos pelo RE parece depender do modelo e do tipo celular utilizado em análise, porém, de uma forma geral, comparando a afinidade de ligação de vários estudos, os fitoestrógenos apresentam uma afinidade maior para o RE β do que para o RE α . Isto sugere que os efeitos das isoflavonas, por intermédio do RE, são mediados pelo receptor do tipo β (Belcher e Zsarnovszky, 2001).

O FDA aprovou em 1999 o apelo de saúde (“health claim”) para os produtos a base de soja, pois diversas investigações científicas, testes clínicos e dados epidemiológicos indicaram que o consumo de soja (pelo menos 25 g/dia) reduz o risco de doença coronariana vascular associada à ingestão de pequenas quantidades de gordura saturada (ADA, 1999). O consumo de proteína de soja quando comparada com a caseína leva a um decréscimo da peroxidação lipídica arterial (Sirtori *et al.*, 2005) e o pré-tratamento com daidzeína se mostrou eficaz em proteger contra o dano lipídico provocado pelo etanol em jejuno de ratos (Nakagawa *et al.*, 2006). Outros benefícios compreendem a melhora do perfil lipídico sanguíneo (Zhan e Ho, 2005), redução da apoptose em modelos *in vivo* de isquemia coronariana, através da inibição da liberação de citocinas reguladas pelo NF-kB em ratos tratados com daidzeína (Kim *et al.*, 2009) e a ação inibitória sobre a tirosina cinase em coelhos tratados com daidzeína e genisteína (Okubo *et al.*, 2004). Assim sendo, o potencial benéfico das isoflavonas em vários aspectos da saúde humana vem sendo muito investigado, e desta forma, as evidências sugerem que o uso primeiramente descrito, no alívio dos sintomas relacionados à menopausa, venha ser ampliado para outras patologias (Duncan *et al.*, 2003).

Muito pouco se conhece sobre os mecanismos e os efeitos do “ambiente estrogênico” que os fitoestrógenos proporcionam ao sistema nervoso. Entretanto já se sabe que as isoflavonas podem agir como agonistas ou antagonistas estrogênicos, dependendo da dose utilizada e do tecido alvo (Belcher e Zsarnovszky, 2001). Tem sido indicado o uso de concentrações moderadas de isoflavonas, já que em altas doses elas podem aumentar o processo de apoptose e degeneração celular em modelos animais (Cooke, 2005). Entretanto, em humanos a avaliação de dados não confirma qualquer risco associado à exposição a dietas de níveis normais com fitoestrógenos, porém, permanece desconhecido o risco associado à exposição a níveis superiores dos mesmos (Belcher e Zsarnovszky, 2001).

Em um estudo de Zhao e colaboradores (2002), os efeitos neuroprotetores e neurotróficos em culturas de neurônios hipocâmpais tratadas com daidzeína e genisteína em baixas doses, < 1µg/mL, demonstrou que estes são capazes de reduzir a liberação da lactado desidrogenase (LDH) quando as culturas são submetidas a modelos de lesão, como exposição ao glutamato ou ao peptídeo β-amilóide₂₅₋₃₅. Sugere-se desta maneira, um efeito sobre a integridade da membrana neuronal, além de promoverem também, o processo de crescimento neuronal demonstrado através de análise morfológica. Em contrapartida, culturas de neurônios de ratos, tratadas com altas concentrações de isoflavonas, entre 50-100µM, induziram neurotoxicidade em estudo de Jin e colaboradores (2007).

O efeito de neuroproteção dos fitoestrógenos também foi descrito para modelos de isquemia cerebral *in vitro*, através de células neuronais corticais de ratos expostas à POG. O pré-tratamento com isoflavonas inibiu a morte celular de maneira dependente dos RE (Schreihofe e Redmond, 2009). Outros estudos mostram ainda o envolvimento destes na inibição da via da enzima glicogênio sintase cinase-3β (GSK-3β) (Kajta *et al.*, 2007) assim como na ativação da via PI3-K (Schreihofe e Redmond, 2009), além de também atenuar a apoptose neuronal induzida por taspigargina, um inibidor cálcio-ATPase de retículo endoplasmático (Linford e Dorsa, 2002).

Outros estudos que podem explicar a neuroproteção das isoflavonas incluem a ação destas como antioxidantes, direta ou indiretamente, aumentando a atividade de enzimas antioxidantes tais como catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GSH-Px) e glutatona redutase (GSH-Rd) (Kurzer e Xu 1997; Youself *et al.*, 2004), a influência sobre o sistema colinérgico, pela redução da perda neuronal relacionada à idade e ao declínio cognitivo em ratos (Lee *et al.*, 2004) e a capacidade de atenuar a fosforilação da proteína *tau*, associada à doença de Alzheimer, demonstrado em estudo de Kim *et al.* (2000).

Na literatura, os poucos estudos sobre a ação de estrógenos mostram que os mesmos podem aumentar os níveis de gangliosídeos em hipocampo de coelhos adultos (Islam, 1986) e diminuir o *turnover* de GM1 na mielina de camundongos durante o desenvolvimento (Ando *et al.*, 1984). Entretanto, nenhum trabalho foi direcionado à investigação dos efeitos das isoflavonas sobre o conteúdo e o perfil dos gangliosídeos.

1.4.2. Resveratrol

O resveratrol (3,4',5-triidroxiestilbeno) é um polifenol presente em pelo menos 72 espécies de plantas com diversas atividades biológicas descritas, que incluem propriedades antioxidantes, antiinflamatórias e antitumorais. As raízes da erva *Polygonum cuspidatum*, utilizada na medicina popular chinesa e japonesa, apresentam os níveis mais elevados de resveratrol (Soleas *et al.*, 1997). Mas foi a descoberta desse polifenol na casca das uvas (Langcake e Pryce, 1976) que despertou a curiosidade científica, sendo o vinho tinto umas das principais fontes do composto na dieta humana (Siemann e Creasy, 1992).

Em 1992, Renaud e Lorgeuil destacaram que a alta ingestão de gorduras saturadas está correlacionada positivamente com a taxa de mortalidade por doenças coronárias cardíacas. Contudo, a situação da França parecia muito paradoxal, visto que nesse país eram encontradas as menores taxas de morte por doenças cardiovasculares. Este paradoxo foi atribuído ao alto consumo de vinho tinto, e a esse fenômeno foi dado o nome de Paradoxo Francês. Desde então, inúmeros trabalhos vem sendo realizados a fim de elucidar os benefícios desta substância.

Além disso, o resveratrol é uma fitoalexina que atua no controle da infecção por fungos. Os níveis de resveratrol variam de acordo com a composição do solo, exposição solar, infecção por fungos a que a uva tenha sido exposta, além do processo de fabricação e conservação dos vinhos (Soleas *et al.*, 1997). Por essas razões, os níveis de resveratrol encontrados nos vinhos tintos variam muito, situando-se em média entre 0,1 e 14,3 mg/L (Souto *et al.* 2001; Baur e Sinclair, 2006).

Nas plantas encontram-se as formas *cis* e *trans*-resveratrol, sendo a forma *trans* responsável pelos efeitos biológicos em mamíferos (Figura 5) (Soleas *et al.*, 1997). A isoforma *cis* é considerada biologicamente menos ativa, embora estudos comparativos recentes demonstrem efeitos semelhantes aos da isoforma *trans* (Yáñez *et al.*, 2006).

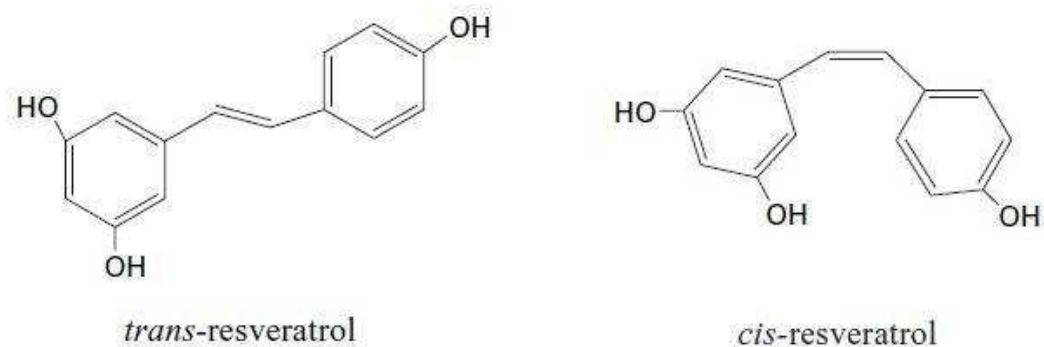


Figura 5. Estrutura química do *cis* e *trans*-resveratrol.

Uma das mais conhecidas propriedades do resveratrol é a capacidade antioxidante, atenuando o acúmulo de espécies reativas de oxigênio. Sabe-se que esse polifenol é capaz de impedir o aumento de radicais livres e a morte por apoptose causada por desequilíbrio oxidativo (Jang e Surh, 2001; Losa 2003; De Salvia *et al.*, 2002); o resveratrol pode atuar como um “scavenger” contra o radical hidroxil e o ânion superóxido (Leonard *et al.*, 2003; Soares *et al.*, 2003). Além disso, ele é capaz de aumentar a atividade das enzimas como a SOD, CAT e GPH-Px de forma dose-dependente (Mokni *et al.*, 2007).

Cada vez mais estudos sugerem que o resveratrol possa exercer um papel significativo regulando funções importantes no SNC, especialmente sob condições patológicas (Doré, 2005). Dados da literatura mostram que o efeito neuroprotetor do resveratrol já foi demonstrado em modelos de lesão cerebral com o peptídeo β -amilóide em culturas de células PC12, atribuindo esse resultado à sua capacidade antioxidante (Jang e Surh, 2003), à inibição de receptores glutamatérgicos pós-sinápticos, diminuindo a excitotoxicidade glutamatérgica (Gao *et al.*, 2006) além de ativar vias de sinalização celular responsáveis por promover a sobrevivência da célula, tais como PI3-K e proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPK) (Das *et al.*, 2005; Klinge *et al.*, 2005).

A neuroproteção do resveratrol em modelos de isquemia cerebral também é alvo de muitas pesquisas. Seus benefícios já foram descritos em modelos de isquemia cerebral *in vivo*, tanto para isquemia cerebral focal (Huang *et al.*, 2001), bem como em isquemia cerebral global (Sinha *et al.*, 2002). Nestes trabalhos, o efeito neuroprotetor foi atribuído fortemente à capacidade antioxidante deste

polifenol. Já em um modelo *in vitro* de isquemia em culturas organotípicas de hipocampo, foi demonstrado que o efeito neuroprotetor do resveratrol envolve a via PI3-K, em especial a ativação da Akt e da ERK1/2 e a inativação da GSK-3 β (Zamin *et al.*, 2006).

Contudo, apesar do grande interesse dos pesquisadores pelo resveratrol, os mecanismos de neuroproteção, além ao da capacidade antioxidante, ainda não estão completamente elucidados (Baur e Sinclair, 2006).

2. OBJETIVOS

Estudar o perfil de gangliosídeos em culturas organotípicas de fatias de hipocampo de ratos submetidas à POG e verificar a possibilidade do mesmo ser utilizado como um parâmetro de avaliação de substâncias neuroprotetoras neste modelo de lesão cerebral.

3. RESULTADOS

Os resultados desta dissertação serão apresentados na forma de um artigo científico a ser submetido à revista ***Journal of Biomedical Science***, cujas instruções encontram-se no anexo (item 8).

Neuroprotective action of resveratrol and daidzein polyphenols and GM1 ganglioside expression in rat hippocampal slices exposed to oxygen-glucose deprivation

Ana Carolina Breier¹, Rudimar Luiz Frozza¹, Fernando Kreutz¹, Melaine Terra²,
Ana Paula Horn¹, Letícia Ferreira Petenuzzo¹, Carlos Alexandre Netto^{1,2}, Christianne
Gazzana Salbego^{1,2} and Vera Maria Treis Trindade^{1,2}

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, ICBS, UFRGS, Brazil.

²Departamento de Bioquímica, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2600 anexo, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil.

Authors e-mail: anacarolinabreier@gmail.com; rlfrozza@yahoo.com.br;
fernandoufrgs@yahoo.com.br; melaineterra@gmail.com;
anapaulahorn@yahoo.com.br; leticiaPETENUZZO@yahoo.com.br;
netto@gabinete.ufrgs.br; salbego@terra.com.br

Correspondence to: Dra Vera Maria Treis Trindade
Departamento de Bioquímica, ICBS, Universidade Federal
do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2600 anexo,
CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil.
Phone: 55 51 3316 5550 Fax: 55 51 3316 5555
e-mail: vmtt@ufrgs.br

Abstract

Background: Ischemic stroke is a second cause of death and the major cause of disability worldwide. Therefore, it is critical to study the mechanisms underlying neuronal degeneration and to evaluate effects of new pharmacological treatments. Gangliosides, a heterogeneous family of glycosphingolipids abundant in the brain, have shown important biochemical roles in cell biology and may be involved in neurodegenerative diseases.

Methods: Using organotypic hippocampal slice cultures exposed to oxygen-glucose deprivation (OGD) as a model of ischemia, we analyzed the neuroprotective action of resveratrol and daizein polyphenols associating it to gangliosides profile.

Results: The profile of gangliosides revealed a specially difference of GM1 expression. The group submitted to OGD had a GM1 expression decrease and in the groups ODG treated with polyphens the GM1 expression was normal. Furthermore, the immunohistochemistry showed a GM1 staining in the region with neurons into hippocampal slices.

Conclusions: These results suggest that these polyphenols neuroprotective action may occur at the level of GM1 ganglioside expression in hippocampal neurons and may contribute preventing cellular death.

Background

Stroke is the second most common cause of death and the major cause of disability in adults worldwide [1]. The brain is highly dependent on continuous blood flow for the supply of oxygen and glucose [2] and ischemic stroke happens when a transient or permanent reduction in cerebral blood flow leads to a complex cascade of cell events resulting in a neuronal death [3, 4]. Therefore, it is critical to identify new, efficacious pharmacological treatments [5], and to study the mechanisms underlying neuronal degeneration through *in vitro* and *in vivo* experimental models. Among the *in vitro* systems used to study ischemia-induced injuries, organotypic hippocampal slice cultures, combined with oxygen-glucose deprivation (OGD), offer great advantages because they mimic closely the *in vivo* condition. Culture slices maintain their cell architecture and interneuron connections, and neurons survive during the long-term culture and physiologically mature over this period, allowing an extended survival study [6, 7].

Polyphenolic compounds are naturally found in fruit, vegetables, plant extracts, wine and teas and their regular consumption is associated with a reduction in the risk of a range of pathological conditions, ranging from hypertension to coronary heart disease (CHD), stroke and dementia [8-10]. It's the case of resveratrol, a polyphenol present in the seeds and skin of grapes and that constitutes one of the major components of red wine. Resveratrol has shown a neuroprotective activity in the brain [11]. Similarly, soy products contain a significant amount of isoflavones, such as daidzein. These substances are called phytoestrogens because of their chemical structure and show neuroprotective effects similar to estrogens [12, 13].

The brain contains many complex lipids. Among them, gangliosides are a family of sialic acid-containing glycosphingolipids present in a high concentration in neuronal membranes. They play important biochemical roles in cell biology, taking part of some processes like cell differentiation and maturation, synaptogenesis, intercellular communication, neuronal plasticity, and cell death/survival process [14-17]. Considering the function diversity of gangliosides in neuronal cells membranes, our objective in this study was to investigate the profile of gangliosides, in order to

evaluate the neuroprotective action of resveratrol and daidzein polyphenols in an *in vitro* model of OGD.

Methods

Animals

In this study were used 6- to 8-day-old male Wistar rats. They were obtained from Department of Biochemistry, Institut of Basic Sciences of Health, UFRGS. All the animal procedures were approved by the University Animal Care Committee (UFRGS).

Organotypic Hippocampal Cultures

Organotypic hippocampal cultures were prepared according to the method of Stoppini *et al.*, (1991) [18]. Hippocampal slices were obtained from 6- to 8-day-old Wistar rats by removing the brain, dissecting hippocampi and making transverse slices (400 μm), using a McIlwain tissue chopper. Slices were separated in ice-cold Hank's balanced salt solution (HBSS) composed of (mM): glucose 36, CaCl_2 1.26, KCl 5.36, NaCl 136.89, KH_2PO_4 0.44, Na_2HPO_4 0.34, MgCl_2 0.49, MgSO_4 0.44, HEPES 25; fungizone 1% (Gibco, Grand Island, NY, USA) and gentamicine 36 $\mu\text{l}/100$ mL (Schering do Brasil, São Paulo, SP, Brazil), pH 7.2. The slices were placed on Millicell culture insert (Millicell®-CM, 0.4 μm , Millipore®, Bedford, MA, USA) and the inserts were transferred to a 6-well culture plate (Cell Culture Cluster, Costar®, New York, NY, USA) with 1 mL of culture medium consisting of 50% minimum essential medium (MEM) (Gibco), 25% heat inactivated horse serum (Gibco) and 25% HBSS (Gibco), supplemented with (mM, final concentration): glucose 36, HEPES 25 and NaHCO_3 4; fungizone 1% (Gibco) and gentamicine 36 $\mu\text{l}/100$ mL (Schering do Brasil); The pH was adjusted to 7.3 with NaOH and immediately after the solution was filtered (Millex-GS, Millipore). The plates were then placed in an incubator at 37°C in an atmosphere of 5% CO_2 . The medium was changed every 3 days and experiments were carried out after 14 days *in vitro*.

Oxygen and Glucose Deprivation (OGD)

The induction of OGD was based on the method described by Strasser and Fischer, (1995) [19], with some modifications [20]. Cultures were carefully rinsed twice with OGD medium consisting of HBSS lacking glucose for 15 min to deplete glucose from intracellular stores and extracellular space. After that, the medium was exchanged for one with the same composition but previously bubbled with N₂ for 30 min and the plate transferred to an anaerobic chamber at 37°C with N₂-enriched atmosphere for 60 min. During this process control slices were maintained in an incubator with 5% CO₂ atmosphere at 37°C. After the deprivation period, slice cultures were incubated in culture medium under normoxic conditions for 24 h, corresponding to the recovery periods.

Radioactive and Drugs exposure

D-[1-¹⁴C] galactose (57mCi/mmol) was purchased from *Amersham Life Science* (Buckinghamshire, UK). Radioactive was diluted with culture medium at a final concentration of 1µCi/mL. The culture medium was replaced by one with D-[1-¹⁴C] galactose 16 h before the OGD to labeling of endogenous ganglioside. Resveratrol was purchased from Gerbras (Goiás, GO, Brasil) and Daidzein was obtained from Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA). Both drugs were dissolved in 0.01% dimethylsulphoxide (DMSO) (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA). Resveratrol at 50 µM and Daidzein at 40 nM were added to the culture medium 16 h before OGD period, and maintained during the OGD and the recovery period of 24 h. Cultures were categorized in following conditions: vehicle-supplemented cultures not exposed to OGD (control DMSO), drugs-supplemented group not exposed to OGD (control resveratrol and control daizdein), vehicle-supplemented cultures exposed to OGD (OGD DMSO), and drug-supplemented group exposed to OGD (OGD resveratrol and OGD daidzein).

Quantification of Cellular Death

Cellular damage was assessed by fluorescent image analysis of propidium iodide (PI) uptake [21]. After a recovery period of 22 h, 5 µM PI (Sigma Chemical) was added to the cultures and incubated for 2 h. PI uptake is indicative of significant membrane injury [22]. Cultures were observed with an inverted microscope (Nikon

Eclipse TE 300) using a standard rhodamine filter. Images were captured and then analyzed using Scion Image software (<http://www.scioncorp.com>). The area where PI fluorescence was detectable above background was determined using the “density slice” option of Scion Image software and compared to the total hippocampal area to obtain the percentage of damage [23].

Extraction, purification and analyses of gangliosides

Slices were washed with cold PBS buffer, and in pairs were homogenized using a Sonicator Ultrasonic Processor (Heat Systems, NY, USA) in a 2:1 mixture of chloroform:methanol (C:M, 2:1, v/v) followed by chloroform:methanol (C:M 1:2, v/v) to extract lipids. After, the extracts were combined and this pool were centrifuged to separated the proteins, and purified by Sephadex-G25 column equilibrated in C:M:Water (60:30:4,5). An aliquot of the purified extract (10%) was quantified in a Liquid scintillation Analyzer Tri-Carb 2800 TR (Perkin Elmer, USA) to determine the total radioactive incorporation into gangliosides. For chromatographic analysis, the purified lipid extract was evaporated under N₂ and analyzed by HPTLC silica gel 60 plates from Merk (Darmstadt, Germany) with two successive solvent systems: C:M (4:1, v/v) followed by C:M:25%CaCl₂ (60:30:4,5, v/v/v) [24]. Radioactive gangliosides profile was visualized by exposing the HPTLC plate to a radiography film (Kodak X-Omat AR) at -70°C for 30 days and their relative contribution was determined by densitometric scanning of the X-ray film in Geliance 600 Image System (PerkinElmer, USA). Standards were visualized by exposure to resorcinol reagent [25]. Protein sediment obtained after lipid extraction was dissolved with NaOH 1N and measured by method the Lowry [26].

Immunohistochemistry

The slices were washed with PBS buffer and fixed with paraformaldehyde 4% to 30 min at 37°C. Then, they were washed with PBS-Triton X-100 (0.01%) for 15 min, and after more six times with PBS. With the slices fixed and permeabilized, the immunohistochemistry was done [27]. The antibodies utilized were: mouse anti-NeuN (1:500) (Millipore, USA) and goat anti-mouse conjugated with Alexa Fluor 555 (1:200) (Invitrogen, USA). The markup using only secondary antibody was performed

to check the specificity. To mark the GM1, the slices were incubated with 10 µg/mL of β-subunit cholera toxin conjugated with FITC (Sigma Chemical). The images were obtained by confocal microscopic Olympus FluoView™ 1000. Objective of 10X was used for observation.

Statistical analyzes

The comparison of data was performed using ANOVA followed by Tukey's post hoc multiple comparison test. Data were represented as mean ± SD. Significant differences were as considered at $P < 0.05$. All statistical analyses were performed using SPSS (Chicago, IL).

Results

Protection of Resveratrol and Daidzein against cell death induced by OGD

The exposure of the cultures to 60 min of OGD and 24 h of recovery caused a marked fluorescence in the hippocampal slices, indicating a high incorporation of PI, as presented in the photomicrograph in Fig. 1A (OGD DMSO group). Quantification of PI fluorescence showed that OGD caused about 20% of damage in hippocampal slices, a significant increase compared to control cultures with a basal hippocampal slices damage of 2% (Fig. 1B). On the other hand, the treatment with 50 µM of resveratrol and 40 nM of daidzein significantly reduced the injury in the hippocampal slices cultures from 20%, to 13 and 9%, respectively (Fig. 1B). Also, no difference was detectable between the treatments in the control slices, indicating that tested drugs had no toxic effect in basal conditions (Fig. 1B).

Effects of Resveratrol and Daidzein upon ganglioside profile

Neither resveratrol nor daidzein were able to alter the total ganglioside radiolabeling (Fig. 2). In spite of this result on total biosynthesis process, the chromatography and densitometric analysis revealed a distinct effect of these polyphenols on the profile and distribution of expressed gangliosides. According to HPTLC (Fig. 3) the main effect determined by OGD in organotypic hippocampal slices cultures was the GM1 expression decrease compared with the control group. This reduction was not

observed in OGD group treated with resveratrol and daidzein. Another effect on ganglioside profile was the increase of GD1b expression in the OGD group compared with control groups. This rise was maintained in the OGD groups treated with the polyphenols (Table 1).

Immunofluorescence staining of GM1 follow the region with neurons

In order to reinforce the observation of distinct GM1 expression obtained by HPTLC, we examined, through adequate double immunofluorescence staining, the expression of GM1 ganglioside and NeuN, a neuronal specific nuclear protein. Results of confocal microscopic analyses from immunostaining organotypic hippocampal slice cultures indicated that GM1 staining (green) was everywhere in the hippocampal slices, but the brightest fluorescence of GM1 followed the region where had more NeuN (red) staining. Furthermore, the induction of OGD organotypic hippocampal slices resulted in a decreased of GM1 ganglioside immunofluorescence staining in the OGD group while the groups treated with resveratrol or daidzein, not showed such reduction (Fig. 4).

Discussion

The mechanisms underlying neuronal degeneration after an ischemic stroke, in spite of research advances, are not fully elucidated. Understanding the biochemical bases of ischemic cascade, therefore, is an important knowledge about the pathogenesis of some of the major causes of neurological morbidity and mortality across in the world.

Polyphenolic compounds are naturally found in fruit, vegetables, plant extracts, wine and teas and their regular consumption is associated with diverse health benefits [10]. This work explored a new viewpoint of neuroprotective action for resveratrol and daidzein evaluating ganglioside profile. Resveratrol and daidzein are substances studied for a long time and many researches reported some of their roles in ischemia. Their benefits have been described in signaling pathways as activating PI3-k and inactivating GSK-3 β [28-31], decreasing oxygen reactive species [32],

increasing enzymatic activities of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase [33] and preventing damage from glutamate toxicity [34, 35].

Organotypic hippocampal slice cultures exposed to oxygen-glucose deprivation (OGD) have been used to examine mechanisms of cell death and to evaluate drugs treatments in this *in vitro* model of “ischemic-like insult” [20, 23, 36, 37]. This methodology provides good experimental access to mimic pathophysiological pathways in living tissues, preserving cell and tissue organization [18]. In particular, hippocampal slices culture combined with OGD can provide an alternative system to investigate cell loss following ischemic injury to the brain and to make easy therapeutic agents studies. In this work we used polyphenol concentrations reported in the literature which were free of neurotoxicity and at the same time were neuroprotective [35, 37, 39].

Propidium iodide (PI) uptake was used to evaluate the cell death. We could observe that resveratrol at 50 μ M and daidzein at 40 η M were able to protect organotypic hippocampal slices culture against cell death induced by ODG. None of both polyphenols showed toxic effect in basal conditions. Previous data of resveratrol neuroprotective action were confirmed [37] and in addition, we reported at the first time a neuroprotective action of daidzein in an *in vitro* model of “ischemic-like insult”.

Effects of ischemia on ganglioside biosynthesis is a field of study with few reports. A study with an *in vivo* neonatal hypoxia-ischemia model demonstrated a significantly decrease of total ganglioside content after the injury in rat hippocampus. However, the chromatography profile did not suffer differences in this work [40]. The ganglioside biosynthesis in rat hippocampus revealed a decrease, of GM3 and GM2 synthase enzymatic activity resulting in an accumulation of GM3, a simple ganglioside, precursor of the others gangliosides [41]. Another study reported that the effect of ischemia on the expression of gangliosides in cerebral cortex showed differences in the chromatographic profile, an increase of GM3 and GM1, suggesting that these glycolipids have modulatory roles in the cascade process in ischemic cortex [42].

In this work we observed a similar total ganglioside metabolic radiolabeling in all groups, while the chromatographic profile showed a different expression for some of these glycosphingolipids. The OGD group presented a significant reduction of GM1 expression. Unlike this finding, the OGD groups treated with polyphenols,

daidzein or resveratrol, had their GM1 expression similar to their control groups. Moreover, an increase in GD1b expression was also observed in both groups, OGD and OGD groups treated with polyphenols. The gangliosides, GT1b, GD1a, GD3 and GM3 did not show differences in their expression between the studied groups.

The significance of GD1b expression increase is not clear, mainly due to controversial knowledge about the biochemical or signaling roles related to this specie of ganglioside. Literature reports its involvement in apoptosis induction [43] or in apoptosis suppression [44]. Analyzing the relationship between data presented in Table 1 for GD1b and GM1 (associated with neuroprotection), it can be obtained the value 9.3 for OGD group and lower values for groups treated with resveratrol and daidzein (2.9 and 3.1, respectively). Than, in this work, probably, GD1b has an apoptosis activity which is attenuated by GM1 expression increase in OGD groups treated with polyphenols.

Several researches have studied the role of GM1 ganglioside and its regulatory role has been suggested in many aspects of neuronal biology. This ganglioside is able to reduce the outflow of glutamate, aspartate and glycine in cerebral cortex of rats after one episode of transient cerebral ischemia [45]. Its relationship to processes of neuronal maturation has also been described, especially neuritogenesis [46]. And its endogenous synthesis was attributed to the neuroprotective capacity by modulating the ischemic cascade in cerebral cortex [42]. Moreover, the neuroprotective effect has been attributed to its antioxidant action, reported both *in vitro* [47-49] and *in vivo* [50-52]. In fact, GM1 inhibits lipid peroxidation and protects receptors and enzymes, such as Na⁺, K⁺-ATPase against oxidative damage induced by ischemia [53], in addition to increasing the levels of antioxidant enzymes such as catalase, superoxide dismutase and glutathione peroxidase [54]. Furthermore, the effect of GM1 on vasodilation is also a hypothesis worked, possibly by activation of endothelial nitric oxide synthase, an important enzyme in the control of vasodilatation. Corroborating these data, it was seen that GM1 induces activation of TrkC receptors [55, 56] which would lead to an increase in nitric oxide production in cerebral endothelial cells. Available data in the literature, report that GM1 was also able to: mediate the release of neurotrophins [16, 57]; activate various signaling pathways such as ERK1/2 and PI3-K [56, 58-61].

The ganglioside GM1 is widely distributed throughout the cells of the nervous system [62]. Markings done by immunohistochemistry allowed us to visualize its presence throughout the tissue of hippocampal slice. However, we observed one peculiarity in its distribution with the double marking for NeuN. The region of concentration of neurons, marked by NeuN, is accompanied by an increased presence of GM1, characterized by more intense fluorescence brightness. These results also support our hypothesis that the neuroprotective action of polyphenols used in our study is mediated via endogenous GM1 mainly present in neurons.

There are few studies about polyphenols effects on ganglioside contents and profile. Estradiol administration determined an increase of ganglioside concentration in rabbit hippocampus and a decrease in brain GM1 turnover [63, 64]. Until this day, not any report described an investigation of resveratrol or soy isoflavones effects on gangliosides profile. In this work, using organotypic hippocampal slice cultures exposed to oxygen-glucose deprivation (OGD) as a model of ischemia, we related the neuroprotective action of those polyphenols associating it to maintenance of GM1 expression. This ganglioside has been described as a neuroprotective substance which can act through different mechanisms, such as the antioxidant effect and the potentiation of neurotrophic factors.

Conclusions

Our data suggest that the neuroprotective action of resveratrol and daidzein may be occur at the level of GM1 ganglioside expression in hippocampal neurons and may contribute in preventing cellular death. Further studies are necessary for understanding the precise mechanism of these observations.

Acknowledgements

This work was supported by grants from PRONEX-FAPERGS, PIBIC-CNPq/UFRGS, CNPq and IBNET. We would like to thank to PhD Fátima T.C.R. Guma and Henrique Beck for helpful assistance in confocal microscopic images.

References

1. Donnan GA, Fisher M, Macleod M, Davis SM: **Stroke**. *Lancet* 2008, **371**:1612–1623.
2. Lipton P: **Ischemic cell death in brain neurons**. *Physiol Rev* 1999, **79**:1431-1568.
3. Lo EH, Dalkara T, Moskowitz MA: **Mechanisms, Challenges and Opportunities in Stroke**. *Nat Rev Neurosci* 2003, **4**:399-415.
4. Lakhan SE, Kiecheggessner A, Hofer M: **Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches**. *J Transl Med* 2009, **7**:79.
5. Biraboneye AC, Madonna S, Laras Y, Krantic S, Maher P, Kraus JL: **Potential neuroprotective drugs in cerebral ischemia: new saturated and polyunsaturated lipids coupled to hydrophilic moieties: synthesis and biological activity**. *J Med Chem* 2009, **52**:4358-4369.
6. Xiang Z, Hrabetova G, Moskowitz SI, Casaccio-bonnefil P, Young SR, Nimmrich VC, Tiedge H, Eineheber S, Karnup S, Bianchi R, Bergold PJ: **Long-term maintenance of mature hippocampal slices in vitro**. *J Neuroscience Meth* 2000, **98**:145-154.
7. Muller D, Buchs PA, Stoppini L: **Time course of synaptic development in hippocampal organotypic cultures**. *Dev Brain Res* 1998, **71**:93-100.
8. Sun AY, Wang Q, Simonyi A, Sun GY: **Botanical Phenolics and Brain Health**. *Neuromol Med* 2008, **10**:259–274.
9. Campos-Esparza MR, SánchezGómez MV, Matute C: **Molecular mechanisms of neuroprotection by two natural antioxidant polyphenols**. *Cell Calcium* 2009, **45**:358–368.
10. Ghosh D, Scheepens A: **Vascular action of polyphenols**. *Mol Nutr Food Res* 2009, **53**:322–331.
11. Doré S: **Unique Properties of Polyphenol Stilbenes in the Brain: More than Direct Antioxidant Actions; Gene/Protein Regulatory Activity**. *Neurosignals* 2005, **14**:61–70.
12. Belcher SM, Zsarnovszky A: **Estrogenic Actions in the Brain: Estrogen, Phytoestrogens, and Rapid Intracellular Signaling Mechanisms**. *J Pharmacol Exp Ther* 2001, **299**:408-414.

13. Schreihof DA, Redmond L: **Soy phytoestrogens are neuroprotective against stroke-like injury *in vitro*.** *Neuroscience* 2009, **158**:602-609.
14. Hakomori SI: **Bifunctional Role of Glycosphingolipids: modulators for transmembrane signaling and mediators for cellular interactions.** *J Bio Chem* 1990, **256**:18713-18716.
15. Hicks D, Heidinger V, Mohand-Said S, Sahel J, Dreyfus H: **Growth Factors and Gangliosides as Neuroprotective Agents in Excitotoxicity and Ischemia.** *Gen Pharmac* 1998, **30**:265-273.
16. Mocchetti I: **Exogenous gangliosides, neuronal plasticity and repair, and the neurotrophins.** *Cell Mol Life Sci* 2005, **62**:2283-2294.
17. Yu RK, Nakatani Y, Yanagisawa M: **The role of glycosphingolipid metabolism in the developing brain.** *J Lipid Res* 2009, **50**(Suppl):440-445.
18. Stoppini L, Buchs P-A, Muller D: **A simple method for organotypic cultures of nervous tissue.** *J Neurosci Meth* 1991, **37**:173-186.
19. Strasser U, Fischer G: **Quantitative measurement of neuronal degeneration in organotypic hippocampal cultures after combined oxygen/glucose deprivation.** *J Neurosci Meth* 1995, **57**:177-186.
20. Cimarosti H, Rodnight R, Tavares A, Paiva R, Valentin L, Rocha E, Salbego CG: **An investigation of neuroprotective effect of lithium in organotypic slices culture of rat hippocampus exposed to oxygen and glucose deprivation.** *Neurosci Lett* 2001, **315**:33-36.
21. Noraberg J, Kristensen BW, Zimmer J: **Markers of neuronal degeneration in organotypic slice cultures.** *Brain Res Prot* 1999, **3**:278-290.
22. Macklis JD, Madison RD: **Progressive incorporation of propidium iodide in culture mouse neurons correlates with declining electrophysiological status: A fluorescence scale of membrane integrity.** *J Neurosci Meth* 1990, **31**:43-46.
23. Valentim LM, Rodnight R, Geyer AB, Horn AP, Tavares A, Cimarosti H, Netto CA, Salbego CG: **Changes in heat shock protein 27 phosphorylation and immunoccontent in response to preconditioning to oxygen and glucose deprivation in organotypic hippocampal cultures.** *Neuroscience* 2003, **118**:379-386.

24. Nores GA, Mizutamari RK, Kremer DM: **Chromatographic tank designed to obtain highly reproducible high-performance thin-layer chromatograms of gangliosides and neutral glycosphingolipids.** *J Chromatogr A* 1994, **686**:155-157.
25. Lake BD, Goodwin HJ: **Lipids.** In *Chromatographic and Eletrophoretic Techniques. Paper and Thin Layer Chromatography. volume 1.* Edited by Smith I, Seakins JWR. London: William Heinemann Medical Bookes Ltd; 1976: 345-366.
26. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: **Protein measurement with the Folin phenol reagent.** *J Biol Chem* 1951, **193**:265-267
27. Hoffman, G: **Seeing Is Believing: Use of Antibodies in Immunocytochemistry and *In situ* Hybridization.** In *Short Course II of SfN's 38th Annual Meeting: 15-19 November 2008; Washington, DC.* Society for Neuroscience; 2008.
28. Das S, Fraga CG, Das DK: **Cardioprotective effect of resveratrol via HO-1 expression involves p38 map kinases and PI-3-kinase signaling, but does not involve NFkappaB.** *Free Radic Res* 2005, **40**:1066-1075.
29. Klinge CM, Blanquenship KA, Risinger KE, Bhatnagar S, Noisin EL, Sumanasekera WK, Zhao L, Brey DM, Keynton RS: **Resveratrol and estradiol rapidly activate MAPK signaling through estrogen receptor alpha and beta in endothelial cells.** *Biol Chem* 2005, **280**:7460-7468.
30. Schreihof DA, Redmond L: **Soy phytoestrogens are neuroprotective against stroke-like injury *in vitro*.** *Neuroscience* 2009, **158**:602-609.
31. Kajta M, Domin H, Gryniewicz G, Lanson W: **Genistein inhibits glutamate-induced apoptotic processes in primary neuronal cell cultures: an involvement of aryl hydrocarbon receptor and estrogen receptor/glycogen synthase kinase-3 β intracellular signaling pathway.** *Neuroscience* 2007, **145**: 592-604.
32. Jang JH, Surh YJ: **Protective effects of resveratrol on hydrogen peroxide-induced apoptosis in rat pheochromocytoma (PC12) cells.** *Mutat Res* 2001, **496**:181-190.

33. Mokni M, Elkahoui S, Limam F, Amri M, Aouani E: **Effect of resveratrol on antioxidant enzyme activities in the brain of healthy rat.** *Neurochem Res* 2007, **32**:981-987.
34. Gao ZB, Chen XQ, Hu GY: **Inhibition of excitatory synaptic transmission by trans-resveratrol in rat hippocampus.** *Brain Res* 2006, **1111**:41-47.
35. Zhao L, Chen Q, Brinton RD: **Neuroprotective and Neurotrophic Efficacy of Phytoestrogens in Cultured Hippocampal Neurons.** *Exp Bio Med* 2002, **227**:509-519.
36. Tavares A, Cimarosti H, Valentim L, Salbego C: **Profile of phosphoprotein labelling in organotypic slice cultures of rat hippocampus.** *Neuroreport* 2001, **12**:2705–2709.
37. Zamin LL, Dillenburg-Pilla P, Argenta-Comiran R, Horn AP, Simao F, Nassif M, Gerhardt D, Frozza RL, Salbego CG: **Protective effect of resveratrol against oxygen-glucose deprivation in organotypic hippocampal slice cultures: Involvement of PI3-K pathway.** *Neurobiol Dis* 2006, **24**:170-182.
38. Horn AP, Gerhardt D, Geyer AB, Valentim LM, Cimarosti H, Tavares A, Horn F, Lenz G, Salbego CG: **Cellular death in hippocampus in response to PI3-k pathway inhibition of oxygen and glucose deprivation.** *Neurochem Res* 2005, **30**:355- 361.
39. Jin Y, Wu H, Cohen EM, Wei J, Jin H, Prentice H, Wu J: **Genistein and daidzein induce neurotoxicity at high concentrations in primary rat neuronal cultures.** *J Biomed Sci* 2007, **14**:275-284.
40. Ramirez MR, Muraro F, Zylbersztein DS, Abel CR, Arteni NS, Lavinsky D, Netto CA, Trindade VM: **Neonatal hypoxia-ischemia reduces ganglioside, phospholipid and cholesterol contents in the rat hippocampus.** *Neurosci Res* 2003, **46**:339-347.
41. Trindade VM, Daniotti JL, Raimondi L, Chazan R, Netto CA, Maccioni HJ: **Effects of neonatal hypoxia/ischemia on ganglioside expression in the rat hippocampus.** *Neurochem Res* 2001, **26**:591-597.
42. Kwak DH, Kim, SM, Lee DH, Kim JS, Kim SM, Lee SU, Jung KY, Seo BB, Choo YK: **Differential expression patterns of gangliosides in the ischemic cerebral cortex produced by middle cerebral artery occlusion.** *Mol Cells* 2005, **20**:354-60.

43. Takada K, Shimizu J, Kusunoki S: **Apoptosis of primary sensory neurons in GD1b-induced sensory ataxic neuropathy.** *Exp Neurol* 2008, **209**:279-283.
44. Chen X, Chi S, Liu M, Yang W, Wei T, Qi Z, Yang F: **Inhibitory effect of ganglioside GD1b on K⁺ current in hippocampal neurons and its involvement in apoptosis suppression.** *J Lipid Res* 2005, **46**:2580–2585.
45. Phillis JW, O'Regan MH: **GM1 ganglioside inhibits ischemia release of amino acid neurotransmitters from rat cortex.** *NeuroReport* 1995, **6**:2010–2012.
46. Ledeen RW: **Biology of gangliosides: neuritogenic and neuronotrophic properties.** *J Neurosci Res* 1984, **12**:147-159.
47. Maulik N, Das DK, Gogineni M, Cordis GA, Avrova N, Denisova N: **Reduction of myocardial ischemic reperfusion injury by sialylated glycosphingolipids, gangliosides.** *J Cardiovasc Pharmacol* 1993, **22**:74-81.
48. Avrova NF, Tyurin VA, Tyurina YY, Kagan VE: **Gangliosides in postischemic cellular dysfunctions.** *Annals of the New York Academy of Sciences* 1994, **723**:353-355.
49. Avrova NF, Zakharova IO, Tyurin VA, Tyurina YY, Gamaley IA, Schepetkin IA: **Different metabolic effects of ganglioside GM1 in brain synaptomes and phagocytic cells.** *Neurochem Res* 2002, **27**:751-759.
50. Figuera MR, Bonini JS, de Oliveira TG, Frussa-Filho R, Rocha JBT, Dutra-Filho CS, Rubin MA, Mello CF: **GM1 ganglioside attenuates convulsions and thiobarbituric acid reactives substances production induced by the intrastriatal injection of methylmalonic acid.** *Int J Biochem & Cell Biol* 2003, **35**:465-473.
51. Figuera MR, Bonini JS, Frussa-Filho R, Dutra-Filho CS, Hagen ME, Rubin MA, Mello CF: **Monosialoganglioside increases catalase activity in cerebral cortex of rats.** *Free Rad Res* 2004, **38**:495-500.
52. Figuera MR, Royes RFF, Furian AF, Oliveira MS, Fiorenza NG, Frussa-Filho R, Petry JC, Coelho RC, Mello CF: **GM1 ganglioside prevents seizures, Na⁺, K⁺ATPase activity inhibition and oxidative stress induced by glutaric acid and pentilenotetrazol.** *Neurobiology Disease* 2006, **22**:611-623.

53. Mahadik SP, Hawver DB, Hungund BL, Li YS, Karpiak SE: **GM1 ganglioside treatment after global ischemia protects changes in membrane fatty acids and properties of Na⁺, K⁺, ATPase and Mg²⁺ ATPase.** *J Neurosc Res* 1989, **24**:402-412.
54. Mahadik SP, Makar TK, Murthy JN, Ortiz A, Wakade CG, Karpiak SE: **Temporal changes in superoxido dismutase, glutathiona peroxidase, and catalase levels in primary and peri-ischemic tissue. Monossialganglioside (GM1) treatments effects.** *Mol Chem Neurophat* 1993, **18**:1-14.
55. Rabin SJ, Bachis A, Mocchetti I: **Gangliosides Activate Trk Receptors by Inducing the Release of Neurotrophins.** *J Bio Chem* 2002, **277**:49466-49472.
56. Duchemin AM, Qun R, Lili M, Norton HN, Hadjiconstantinou M: **GM1 ganglioside induces phosphorylation and activation of Trk and Erk in brain.** *J Neurochem* 2002, **81**:696–707.
57. Bachis A, Rabin SJ, Fiacco M, Mocchetti I: **Gangliosides Prevent Excitotoxicity Through Activation of TrkB Receptor.** *Neurotox Res* 2002, **4**:225-234.
58. Mutoh T, Tokuda A, Miyadai T, Hamaguchi M, Fujiki N: **Ganglioside GM1 binds to the Trk protein and regulates receptor function.** *Cell Bio* 1995, **92**:5087-5091.
59. Pitto M, Mutoh T, Kuriyama M, Ferraretto A, Palestini P, Masserini M: **Infuence of endogenous GM1 ganglioside on TrkB activity, in cultured neurons.** *FEBS Letters* 1998, **439**:93-96.
60. Duchemin AM, Qun R, Norton HN, Hadjiconstantinou M: **GM1-induced activation of phosphatidylinositol 3-kinase: involvement of Trk receptors.** *J Neurochem* 2008, **104**:1466-1477.
61. Mo L, Ren Q, Duchemin AM, Neff NF, Hadjiconstantinou M: **GM1 and ERK signaling in the aged brain.** *Brain Res* 2005, **1054**:125-134.
62. Willison HJ, Yuki N: **Peripheral neuropathies and anti-glycolipid antibodies.** *Brain* 2002, **125**:2591–2625.

63. Ando S, Tanaka Y, Ono Y, Kon K: **Incorporation rate of GM1 ganglioside into mouse brain myelin: effect of aging and modification by hormones and other compounds.** *Adv Exp Med Biol* 1984, **174**:241-248.
64. Islam F, Hasan M, Saxena K: **Isolation and estimation of gangliosides in discrete regions of the forebrain: effects of estrogen on regional lipid profiles.** *Exp Pathol* 1986, **29**:159-164.

Figure legends

Figure 1. Effect of resveratrol and daidzein on cell damage induced by OGD for 60 min in organotypic hippocampal cultures. (A) Representative photomicrographs of slices stained with PI after 24 h after exposure to OGD. (B) Quantitative analysis of hippocampus damage 24 h after exposure to OGD. RSV: resveratrol at 50 μ M; Dz: daidzein at 40 η M. They were added before OGD, at the moment of lesion induction and maintained during the recovery period. Bars represent the mean \pm SD, n=6. *Significantly different from control cultures. # Significantly different from control and DMSO-treated OGD cultures (two-way ANOVA followed by Tukey test, P<0.05).

Figure 2. Quantification of total ganglioside radiolabeling (measured as cpm/ μ g protein) obtained from organotypic hippocampal slice cultures exposed to OGD and treated with resveratrol or daidzein. Gangliosides were extracted and purified with Sephadex G-25 column as described in Material and Methods. C: control; RSV: resveratrol at 50 μ M; Dz: daidzein at 40 η M. Bars represent the mean \pm SD, n=6. (two-way ANOVA followed by Tukey test, p<0,05).

Figure 3. High performance thin layer-autoradiography of D-[1-C¹⁴] galactose labeled endogenous gangliosides from organotypic hippocampal slice cultures exposed to OGD and treated with resveratrol or daidzein. Gangliosides were extracted, purified with Sephadex G-25 column and analysed by HPTLC, as described in Material and Methods. C: control; RSV: resveratrol at 50 μ M; Dz: daidzein at 40 η M; O: origin. The position of co-chromatographed ganglioside standards is indicated. The present results are representative of six independent experiments.

Figure 4. Confocal studies of organotypic hippocampal slice cultures exposed on OGD and treated with daidzein or resveratrol. (A) Representative images of the groups Control and OGD (DMSO, Dz and Rsv). n= 5; A, immunofluorescence staining of GM1 in green; B, immunofluorescence staining of NeuN in red; C, merged images of A and B, indicating that brightest GM1 colocalizes in the region of hippocampal neurons. RSV: resveratrol at 50 μ M; Dz: daidzein at 40 η M. Confocal

images were at 10X objective. Bars, 200 μ m. (B) Zoom in representation of the arrow in A.

Table 1. Desitometric analysis of labeled endogenous gangliosides.

	Control			ODG		
	DMSO	Rsv	Dz	DMSO	Rsv	Dz
GM3	14.4 \pm 4.2	14.9 \pm 1.6	15.7 \pm 6.2	16.7 \pm 1.5	17.2 \pm 1.2	17.9 \pm 2.8
GM1	5.7 \pm 0.6	5.5 \pm 0.5	6.2 \pm 2.4	2.9 \pm 1.0*	7.9 \pm 1.3	8.1 \pm 2.2
GD3	15.6 \pm 0.8	10.4 \pm 5.3	12.6 \pm 6.1	10.8 \pm 2.2	9.8 \pm 3.2	9.1 \pm 3.4
GD1a	24.3 \pm 2.4	24.3 \pm 5.9	28.1 \pm 10	21.2 \pm 3.6	19.2 \pm 3.9	18.5 \pm 3.5
GD1b	15.5 \pm 2.3	18.7 \pm 1.9	15.5 \pm 5.4	27.2 \pm 1.9*	23.2 \pm 3.6*	25.7 \pm 4.1*
GT1b	24.4 \pm 1.9	26.2 \pm 1.0	21.9 \pm 8.0	21.4 \pm 3.1	21.6 \pm 5.9	20.8 \pm 1.4

Results correspond to densitometric analysis of six HPLC-autoradiography as showed in Figure 3. Each ganglioside is expressed as a percentage of the total radioactivity incorporated into all ganglioside bands. Data represent mean \pm SD (*) Significantly different from control cultures (two-way ANOVA followed by Tukey test, $p < 0.05$).

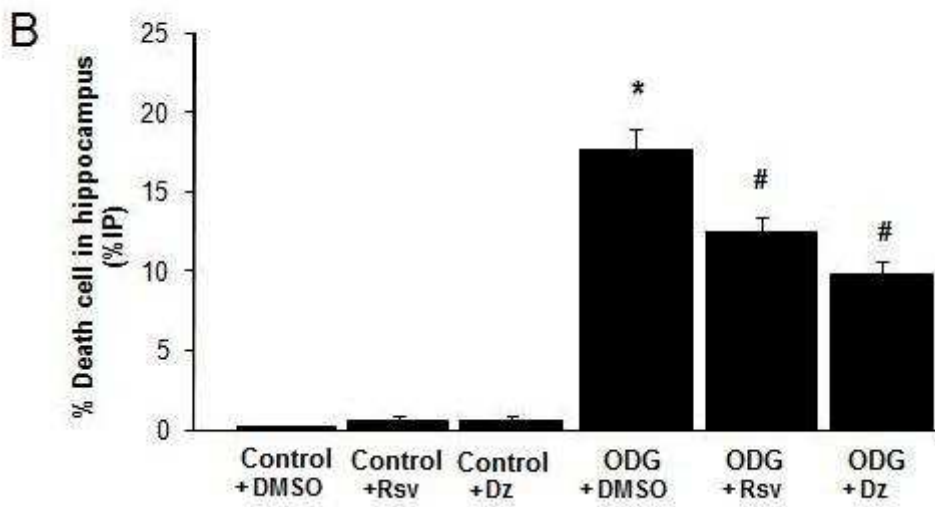
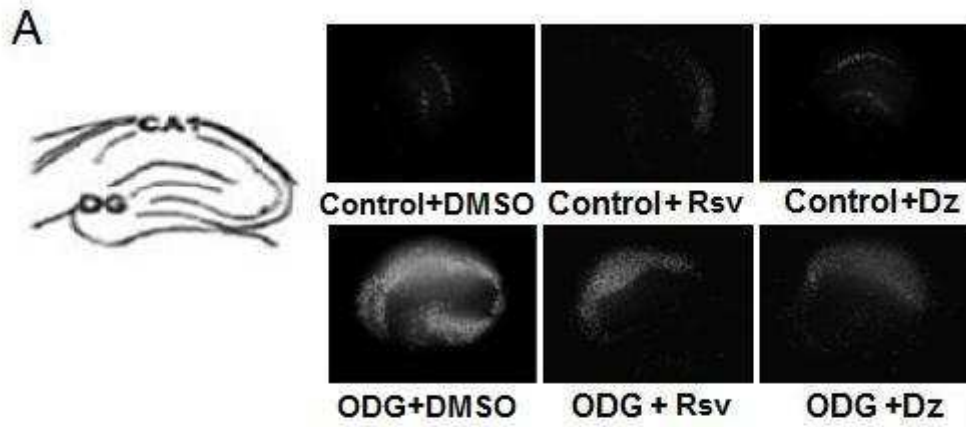


Figure 1

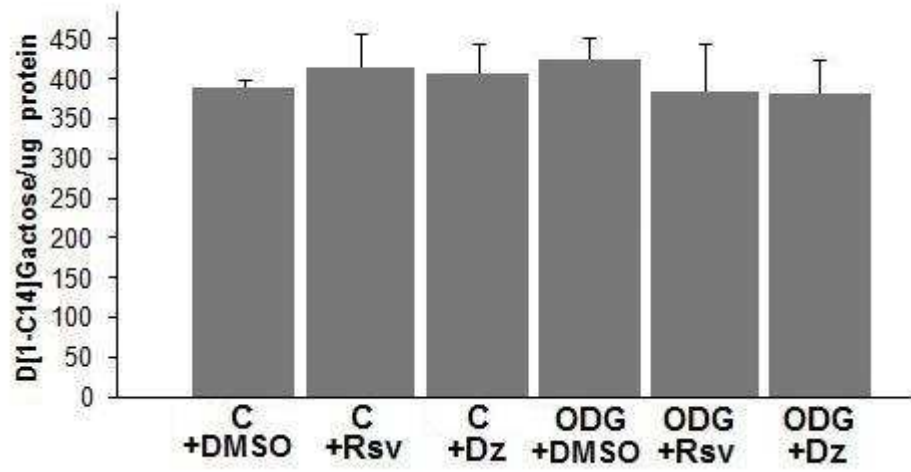


Figure 2

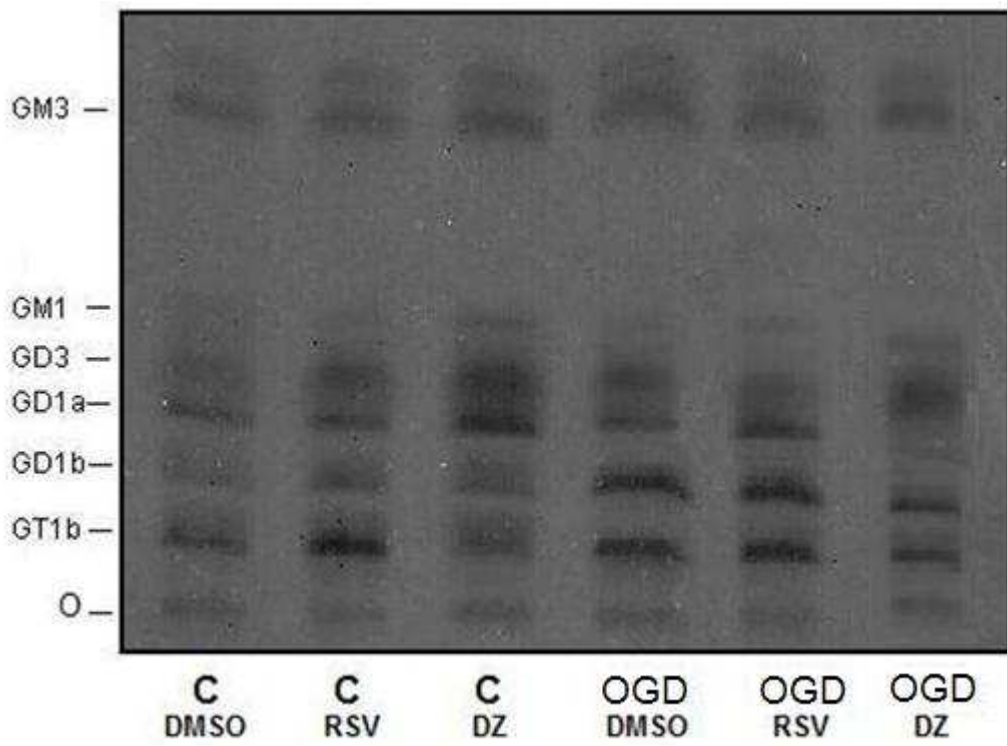
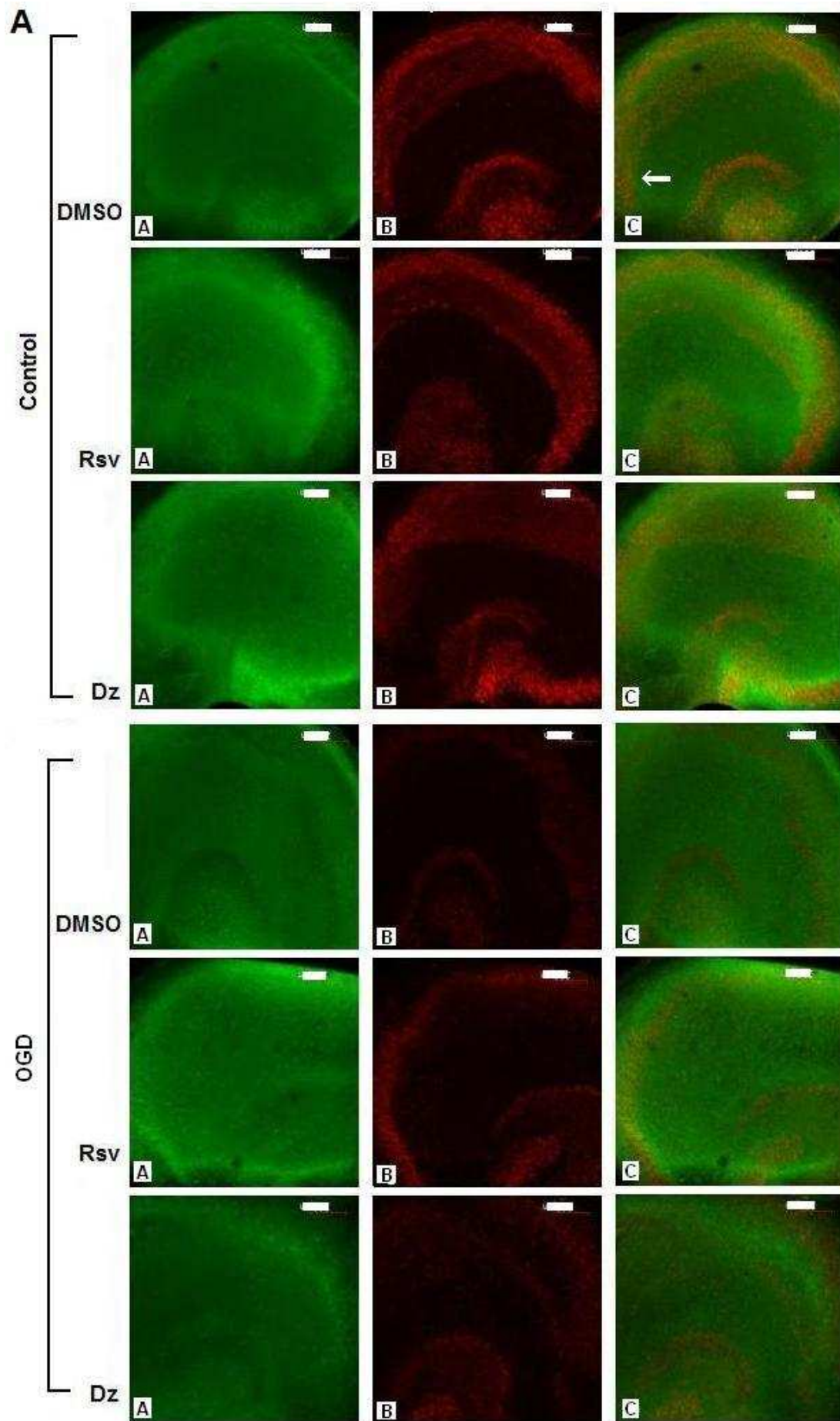


Figure 3



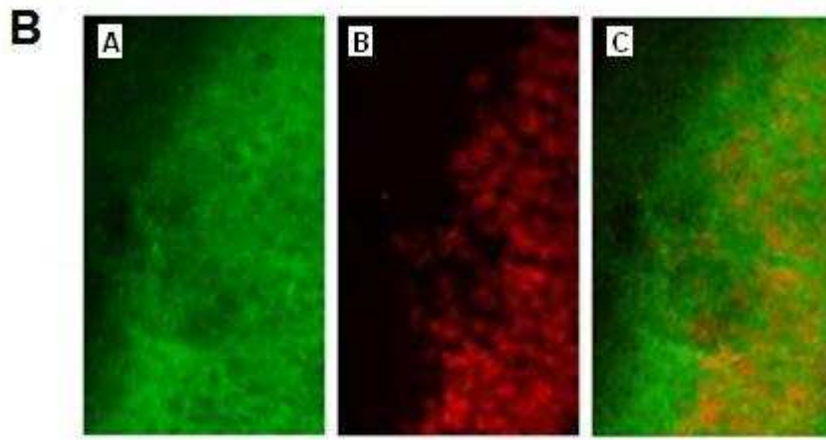


Figure 4

4. DISCUSSÃO

Os altos índices de mortalidade e morbidade somando-se a dificuldade em eliminar por completo as causas que resultam no evento isquêmico, tornam atraentes as pesquisas com o objetivo de identificar e tratar os mecanismos desencadeados após a isquemia (Buonocore e Perrone, 2004). Durante os últimos anos, um grande número de estudos tem sugerido biomarcadores para a isquemia cerebral. Alguns eventos bioquímicos envolvidos durante a morte celular após o dano isquêmico estão bem descritos para essa patologia. É o caso da excitotoxicidade mediada, principalmente, pela liberação de glutamato, a formação de espécies reativas, o aumento de cálcio intracelular, a acidose láctica e a produção de agentes pró-inflamatórios (Lakhan *et al.*, 2009). Sabe-se também que o dano na membrana celular é crítico para a integridade da célula, considerando desta maneira, a importância de estudar o papel dos glicoesfingolipídios nas lesões do SNC, em especial os gangliosídeos, abundantes nas membranas celulares das células neuronais.

Neste sentido, os estudos *in vitro* através de cultivo de tecidos e células são bastante utilizados para a avaliação de processos neurodegenerativos e para a investigação de drogas com potencial efeito neuroprotetor. Os ensaios *in vitro* têm como vantagens a redução do número de animais por experimento, um maior controle sobre os parâmetros bioquímicos e/ou fisiológicos que podem influenciar os resultados e a maior facilidade de avaliar os mecanismos de ação para determinado efeito no nível celular e molecular (Gebhardt, 2000). Além disso, a manutenção da organização do tecido e da integridade das células, permitindo a comunicação entre neurônios e entre neurônios e glia são características muito vantajosas no cultivo de tecidos. Em nosso estudo foi utilizado o modelo de culturas organotípicas de fatias hipocâmpais de ratos, visto que esta é uma estrutura cerebral bastante vulnerável frente ao dano isquêmico (Schmidt-Kastner e Freund, 1991). O modelo de POG, mimetizando as condições isquêmicas, já foi validado e é rotineiramente utilizado pelo grupo de pesquisa orientado pela Dra. Christianne Salbego para a investigação de novos agentes terapêuticos visando a neuroproteção (Cimarosti *et al.*, 2001, 2005, 2006; Ghisleni *et al.*, 2003; Porciúncula *et al.*, 2003; Siqueira *et al.*, 2004 a;

Zamin, *et al.*, 2006; Wilot *et al.*, 2007; Konrath *et al.*, 2008; Thomasi *et al.*, 2008; Simão *et al.*, 2009).

Nos últimos anos, as pesquisas com isoflavonas da soja vêm aumentando. Entre os motivos de interesse nesta área está a incorporação definitiva deste alimento nos hábitos alimentares ocidentais, apesar de conhecida e usada no Oriente há mais de cinco mil anos. A expansão do mercado agrícola a partir da década de vinte ganhou força, e hoje, a produção desta leguminosa vêm crescendo anualmente, sendo o Brasil o segundo maior produtor mundial, e o Rio Grande do Sul um estado de importante tradição no cultivo da soja em nosso país (Embrapa Soja).

Os benefícios das isoflavonas presentes na soja à saúde humana são citados em diversos aspectos, tais como: a melhora do perfil lipídico, diminuindo o LDL e aumentando o HDL, favorecendo as condições cardiovasculares (Zhan e Ho, 2005), a redução dos sintomas do climatério, como ondas de calor e insônia, através das suas propriedades estrogênicas (Belcher e Zsarnovszky, 2001), que torna o uso das mesmas muito prescrito como suplemento alimentar a pacientes que sofrem destes sintomas típicos durante essa fase. Além disso, trabalhos mostram que as isoflavonas de soja podem diminuir os riscos de câncer de próstata e mama (Barnes *et al.*, 1996; Denis *et al.*, 1999). Estes e outros efeitos fizeram a ANVISA (2006) reconhecer a soja como um alimento funcional, devido à presença das isoflavonas no grão deste alimento. As isoflavonas são consideradas fitoestrógenos naturais, de origem vegetal, responsáveis pelos benefícios à saúde de quem delas usufrui.

A ação neuroprotetora das isoflavonas presentes na soja foi demonstrada em um modelo de cultura de neurônios hipocâmpais, expostas a excitotoxicidade glutamatérgica e tratados com diferentes concentrações de genesteína e a daidzeína (Zhao *et al.*, 2002). Neste estudo de Zhao e colaboradores foram definidas que concentrações iguais ou abaixo de 1 µg/mL estão livres de qualquer sinal de toxicidade. Além disso, em um modelo *in vitro* de privação de glicose e oxigênio, neurônios corticais pré-tratados com isoflavonas em uma faixa de concentração de 0,1 – 1µM apresentaram redução na liberação da LDH (Schreihofer e Redmond, 2009). Por outro lado, altas concentrações, de 50 µM até 100 µM, de genesteína e daidzeína induziram neurotoxicidade em cultura de neurônios primários de ratos (Jin *et al.*, 2007).

Considerando a importância da concentração da isoflavona, realizamos experimentos preliminares para determinar qual a melhor dose para utilização neste trabalho. Inicialmente, foi analisada a ação neuroprotetora das isoflavonas genisteína e daidzeína nas concentrações de 40 η M e 200 η M avaliando a morte celular, através da incorporação do corante iodeto de propídio (IP). O IP é uma substância capaz de intercalar-se ao DNA, gerando fluorescência frente à luz UV, sendo um bom indicativo da morte celular por necrose quando a membrana da célula é rompida após algum dano (Macklis e Madison, 1990). Os resultados preliminares mostraram que a daidzeína na concentração de 40 η M apresentou a melhor ação comparada com a concentração de 200 η M de daidzeína e com a isoflavona genisteína em ambas as concentrações testadas. Desta maneira, para otimizar os custos da pesquisa, a isoflavona daidzeína na concentração de 40 η M foi escolhida para dar seqüência ao estudo. Além disso, o diluente DMSO foi testado e não apresentou efeito na morte neuronal e por isso, os controles dos experimentos tornaram-se culturas tratadas com DMSO na concentração de 0.01%.

Para fortalecer os resultados do trabalho, escolhemos analisar em nossos experimentos, juntamente com a isoflavona da soja daidzeína, outro composto polifenólico de importância biológica, o resveratrol. O resveratrol é um polifenol de origem vegetal, presente na casca de uvas, e bem conhecido por suas propriedades antioxidantes, antiinflamatórias e antitumorais (Soleas *et al.*, 1997).

A ação neuroprotetora do resveratrol já foi descrita em modelos de lesão cerebral *in vitro* (Jang e Surh, 2003; Das *et al.*, 2005; Klinge *et al.*, 2005; Gao *et al.*, 2006) como *in vivo* (Huang *et al.*, 2001; Sinha *et al.*, 2002). Inclusive no modelo utilizado por este trabalho, cultura organotípica de fatias hipocâmpais de ratos submetida à POG, a capacidade neuroprotetora do resveratrol foi demonstrada contra o dano isquêmico, nas concentrações de 10, 25 e 50 μ M e seu envolvimento na via de sinalização da PI3-K foi elucidado (Zamin *et al.*, 2006).

Nossos resultados apresentados mostraram que os polifenóis testados, a daidzeína (40 η M) e o resveratrol (50 μ M), foram neuroprotetores, prevenindo a morte neuronal. As drogas em teste foram acrescentadas antes do evento isquêmico e mantidas durante e também após, no período chamado de recuperação. Este protocolo de tratamento foi realizado de acordo com trabalhos anteriores que demonstraram a ação neuroprotetora para o resveratrol neste modelo de cultura

organotípica de hipocampo submetida à POG (Zamin *et al.*, 2006) assim como a ação neuroprotetora do estradiol (Cimarosti *et al.*, 2005), já que, as isoflavonas são fitoestrógenos naturais. Em condições basais, nenhuma das drogas testadas aumentou a incorporação de IP.

O efeito da isquemia sobre os gangliosídios é um campo de estudo ainda pouco explorado. O perfil cromatográfico dos gangliosídios de hipocampo de ratos foi estudado por Ramirez e colaboradores (2003) em um modelo *in vivo* de hipóxia-isquemia neonatal. Neste estudo os resultados mostraram uma diminuição significativa no conteúdo total de gangliosídios no grupo submetido à lesão, quantificado pelo método de resorcinol descrito por Svernerholm (1957) a partir do extrato lipídico da estrutura homogeneizada. Apesar disso, os resultados apresentados para o perfil cromatográfico dos gangliosídios não revelaram diferenças entre os grupos, mantendo a mesma expressão de gangliosídios.

Em nossos resultados, obtivemos uma marcação metabólica dos gangliosídios através da incorporação de D-[1-C¹⁴] galactose semelhante em todos os grupos de estudo. A galactose radioativa é metabolizada pelas células do tecido durante o processo de incubação, sendo convertida a UDP-[1-C¹⁴] galactose capaz de entrar na via de biossíntese dos gangliosídios ou dos demais glicolipídios e glicoproteínas. Desta forma, o dano causado pelo processo de POG nas culturas organotípicas de hipocampo de ratos não causou variação na incorporação de radioatividade total nos gangliosídios analisados através desta metodologia.

Embora em nosso modelo de estudo não tenha ocorrido diferença na incorporação de radioatividade total nos gangliosídios, o perfil cromatográfico revelou uma expressão diferente para alguns destes glicoesfingolipídios. O grupo que sofreu somente o processo de injúria, denominado de POG, apresentou um aumento no conteúdo de GD1b e uma redução significativa de GM1. Ao contrário destes resultados, os grupos que sofreram a POG e foram tratados com os polifenóis, a daidzeína ou o resveratrol também mantiveram o aumento de GD1b, porém o conteúdo de GM1 encontrado foi similar ao dos grupos controles. Os demais gangliosídios revelados e analisados, GT1b, GD1a, GD3 e GM3, não apresentaram diferenças significativas de expressão neste trabalho.

Estudos de biossíntese de gangliosídios de hipocampo de ratos em modelo de hipóxia-isquemia neonatal revelaram uma diminuição na atividade enzimática

para GD3 e GM2 sintase acarretando um acúmulo de GM3, um gangliosídeo simples, precursor dos demais gangliosídeos (Trindade *et al.*, 2001). Outro estudo mostrou que o efeito da isquemia sobre a expressão de gangliosídeos em córtex cerebral evidenciou diferenças no perfil cromatográfico, relatando um aumento de GM3 e de GM1, sugerindo a estes glicolipídios papéis moduladores na cascata do processo isquêmico em córtex (Kwak *et al.*, 2005).

Em nossos resultados, o GM3 não apresentou acúmulo significativo entre os grupos. De fato, o GM3 é estruturalmente simples e precursor dos demais gangliosídeos e o seu acúmulo mostra-se transiente e tende a voltar ao seu conteúdo normal após algumas horas após o evento isquêmico (Trindade *et al.*, 2001; Barrier *et al.*, 2005; Kwak *et al.*, 2005). Devido ao tempo de recuperação de 24h após a POG, esse período pode ter favorecido a metabolização do GM3 em outros gangliosídeos da sua rota de biossíntese das séries “a” e “b”.

O significado do aumento na expressão do GD1b não é muito claro, principalmente em virtude ao conhecimento controverso dos papéis bioquímicos ou sinalizadores atribuíveis a esta espécie de gangliosídeo. Na literatura, Takada e colaboradores (2008) relatou seu envolvimento na indução apoptótica, enquanto outro estudo demonstrou um efeito supressor para apoptose (Chen *et al.*, 2005). Analisando através de uma relação entre os dados apresentados na Tabela 1 para GD1b e GM1(associados com a neuroproteção), obtivemos o valor de 9.3 para o grupo POG e valores diminuídos para grupos tratados com resveratrol e daidzeína (2.9 e 3.1, respectivamente). Possivelmente, neste trabalho, GD1b possa apresentar uma atividade apoptótica que seja atenuada pelo aumento da expressão de GM1 nos grupos tratados com os polifenóis.

A ação neuroprotetora dos polifenóis estudados, daidzeína e resveratrol, vêm sendo relatadas na literatura, entretanto os seus mecanismos de ação ainda não foram completamente elucidados. Os efeitos antioxidantes são bem descritos para a daidzeína (Kurzer e Xu 1997; Yousef *et al.*, 2004; Liang *et al.*; 2008) e para o resveratrol (Jang e Surh, 2001; Losa 2003; De Salvia *et al.*, 2002; Leonard *et al.*, 2003; Soares *et al.*, 2003; Mokni *et al.*, 2007), e acredita-se que grande parte da ação neuroprotetora destas substâncias seja atribuída a essa característica. Porém, o mecanismo definitivo da ação neuroprotetora para essas substâncias ainda

continua sendo investigado por muitos pesquisadores nas mais diferentes linhas de pesquisas.

Em nosso trabalho, o perfil cromatográfico mostrou uma expressão percentual de GM1 semelhante aos grupos controles nos grupos submetidos à POG tratados com os polifenóis, isto é, o efeito da diminuição na expressão de GM1 observado no grupo POG não ocorreu nos grupos POG tratados com daidzeína ou resveratrol. Este dado nos sugere que a ação neuroprotetora das drogas analisadas talvez ocorra no nível deste glicosíngolípido, devido à manutenção da sua expressão nos grupos submetidos ao modelo de injúria com o tratamento.

De fato, o papel regulatório do GM1 tem sido sugerido em muitos aspectos da biologia neuronal. Este gangliosídeo é capaz de reduzir o efluxo de glutamato, aspartato e glicina em córtex cerebral de ratos após um episódio de isquemia cerebral transiente (Phillis e O'Regan, 1995). Também já foi descrito, sua relação em processos de maturação neuronal, em especial a neuritogenesis (Ledeen, 1984). No estudo de Kwak e colaboradores (2005) a síntese endógena do GM1 em córtex durante o processo de isquemia foi atribuída à capacidade neuroprotetora do mesmo, modulando a cascata isquêmica em córtex cerebral.

O uso de GM1 exógeno tem sido proposto para várias patologias do sistema nervoso como doenças cérebro-vasculares (Corolei *et al.*, 1991), isquemia (Lazzaro *et al.*, 1994), hipóxia (Krajnc *et al.*, 1994) e Alzheimer (Svennerholm *et al.*, 2002). Essa diversidade de aplicações clínicas provavelmente esteja relacionada à considerável variedade de mecanismos de ação e de efeitos farmacológicos promovidos por esse glicosíngolípido. Assim sendo, é possível que o GM1 atue de uma forma comum a várias condições patológicas, como por exemplo, no estresse oxidativo. Nesta linha de raciocínio, tem sido sugerido que este gangliosídeo cause neuroproteção devido a sua ação antioxidante tanto *in vitro* (Maulik *et al.*, 1993; Avrova *et al.*, 1994, 2002) como *in vivo* (Figuera *et al.*, 2003, 2004, 2006). 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) e por glutamato (Avrova *et al.*, 2002).

Entretanto, os mecanismos de ação pelos quais o GM1 exerce seu efeito antioxidante ainda não estão completamente esclarecidos e foi sugerido que ele possa atuar diretamente, através da neutralização de radicais hidroxilas e

superóxidos, induzidos por isquemia em coração de ratos *in vitro* (Maulik, 1993). Neste contexto, Mahadik e colaboradores (1993) observaram que a administração de GM1 (10 mg/kg, i.m.) aumentou os níveis de enzimas antioxidantes como a catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase, após uma lesão isquêmica em córtex. Além disso, o efeito do GM1 sobre a vasodilatação também é uma hipótese trabalhada, possivelmente, pela ativação da enzima óxido nítrico sintase endotelial, enzima importante no controle da vasodilatação. Corroborando esses dados, foi visto que GM1 induz a ativação de receptores TrkC (Duchemin *et al.*, 2002; Rabin *et al.*, 2002), o que provocaria um aumento na produção de óxido nítrico em células do endotélio cerebral. Outra possibilidade para o efeito vasodilatador do GM1 pode ser sua ação sobre a atividade das fosfodiesterases. Higashi e colaboradores (1992) sugeriram que os gangliosídeos modulam enzimas dependentes de cálcio-calmodulina, como a fosfodiesterase de nucleotídeos cíclicos. Sabe-se que os inibidores desta enzima induzem o relaxamento das artérias cerebrais isoladas. Sendo assim, o GM1 fornece um sistema de defesa antioxidante adicional, necessário para neutralizar as espécies reativas formadas em decorrência de uma atividade metabólica aumentada (Halliwell e Gutteridge, 1990).

Outros trabalhos vêm demonstrando o papel neuroprotetor do GM1, além do efeito antioxidante já descrito. Segundo os dados disponíveis na literatura, o GM1 seria capaz de: mediar a liberação de neurotrofinas (Bachis *et al.*, 2002; Mocchetti *et al.*, 2005); ativar diversas vias de sinalização, a exemplo das vias da ERK1/2 e da PI3-K (Mutoh *et al.*, 1995; Pitto *et al.*, 1998; Duchemin *et al.*, 2002, 2008; Mo *et al.*, 2005); reverter parte dos efeitos tóxicos de neurotransmissores excitatórios como glutamato (excitotoxicidade glutamatérgica) (Cunha *et al.*, 1999); reduzir a liberação de interleucinas inflamatórias provocadas pela indução do peptídeo β -amilóide (Ariga e Yu, 1999) além de reverter a ativação da via da GSK-3 β por parte do peptídeo beta-amilóide, em um modelo de cultura organotípica de hipocampo de rato (Kreutz 2010).

Considerando os mecanismos descritos para ação neuroprotetora do GM1 e os dados obtidos através do perfil cromatográfico, experimentos de imunohistoquímica foram realizados para reforçar os resultados de expressão do GM1 obtidos por cromatografia. Assim sendo, a dupla marcação para o GM1 e para NeuN proporcionou a visualização e localização de ambos. Além disso, as intensidades

das fluorescências permitiram ver uma marcação fraca de GM1 e também de NeuN no grupo POG. A NeuN é um marcador de proteína nuclear específica de neurônios, e foi escolhida devido a sua importância em caracterizar células neuronais em pesquisas neurobiológicas (Mullen *et al.*, 1992).

A marcação de gangliosídios por imuno-histoquímica já foi realizada em diversos estudos (Kwak *et al.*, 2005; Yin *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2007) e tem sido uma técnica de grande valor científico, agregando mais conhecimento às pesquisas bioquímicas, confirmando resultados e enriquecendo seus conteúdos por revelar detalhes de localizações das moléculas marcadas nos tecidos estudados.

O gangliosídeo GM1 é largamente distribuído por todas as células do sistema nervoso (Willison e Yuki, 2002). Em nossos experimentos, as marcações realizadas por imuno-histoquímica permitiram visualizar a presença de GM1 por todo tecido da fatia hipocampal. Entretanto, foi observado uma particularidade na sua distribuição com a marcação dupla para NeuN. A região de concentração das células neuronais, marcadas pelo NeuN, é acompanhada por uma maior expressão de GM1, caracterizada através de uma fluorescência de brilho mais intenso. Estes resultados também reforçam a nossa sugestão de que a ação neuroprotetora dos polifenóis usados para tratamento em nosso estudo seja mediada via o GM1 endógeno, principalmente de neurônios.

Os estudos sobre os efeitos destes polifenóis sobre os gangliosídios ainda não foram investigados. Na literatura encontram-se escassos trabalhos acerca da ação do estradiol sobre a expressão de gangliosídios (Ando *et al.*, 1984; Islam, 1986). Entretanto, nenhum trabalho foi direcionado à investigação dos efeitos das isoflavonas sobre os mesmos. Em relação ao resveratrol, recentemente seu efeito foi estudado em um modelo de isquemia *in vivo*, demonstrando que o resveratrol foi capaz de reverter a diminuição da expressão de GM1 em hipocampo de rato no grupo isquêmico 24 horas após a lesão (Simão *et al.*, dados ainda não publicados).

Por desconhecer outros estudos sobre o tema, acreditamos que este trabalho, seja o primeiro a demonstrar ação neuroprotetora de substâncias polifenólicas através do perfil cromatográfico dos gangliosídios como um parâmetro de análise em um modelo de cultura organotípica submetido à POG.

5. CONCLUSÕES

Os resultados apresentados neste trabalho permitem concluir que:

- a incorporação de radioatividade total dos gangliosídios não apresentou diferença entre os grupos analisados;
- o perfil cromatográfico dos gangliosídios revelou diferenças na expressão percentual para alguns gangliosídios, em especial o GM1;
- os polifenóis testados, a isoflavona daidzeína e o resveratrol, foram capazes de proteger culturas organotípicas de hipocampo de rato contra a morte celular induzida por POG;
- a ação neuroprotetora dos polifenóis testados poderia ocorrer devido à manutenção da expressão do gangliosídio GM1 nos grupos tratados e submetidos à POG.

Estes dados nos permitem sugerir o uso do perfil cromatográfico de gangliosídios como um parâmetro de análise na investigação de drogas neuroprotetoras em modelos de injúrias cerebrais tais como a POG.

6. PERSPECTIVAS

Estudar o envolvimento dos gangliosídeos, em especial do GM1, na ação neuroprotetora do resveratrol e da daidzeína nas culturas organotípicas de hipocampo de ratos submetidos à POG, nos parâmetros:

- Vias sinalização: como Akt, GS3-K β e ERK1/2 para a daidzeína;
- Stress oxidativo: avaliando enzimas como CAT, SOD e GSH-Px;
- Liberação de neurotrofinas no meio de cultura: como NGF, BDNF e NT3.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADA: **Position of the American Dietetic Association: functional foods.** *J Am Diet Assoc* 1999, **99**:1278-1285.

American Stroke Association, www.strokeassociation.org, acessado em 12 de abril de 2010.

Ando S, Tanaka Y, Ono Y, Kon K: **Incorporation rate of GM1 ganglioside into mouse brain myelin: effect of aging and modification by hormones and other compounds.** *Adv Exp Med Biol* 1984, **174**:241-248.

Ariga T, Yu RK: **GM1 inhibits amyloid beta-protein-induced cytokine release.** *Neurochem Res* 1999, **24**:219-226.

Avrova NF, Tyurin VA, Tyurina YY, Kagan VE: **Gangliosides in postischemic cellular dysfunctions.** *Ann N Y Acad Sci* 1994, **723**:353-355.

Avrova NF, Zakharova IO, Tyurin VA, Tyurina YY, Gamaley IA, Schepetkin IA: **Different metabolic effects of ganglioside GM1 in brain synaptomes and phagocytic cells.** *Neurochem Res* 2002, **27**:751-759.

Bachis A, Rabin SJ, Fiacco M, Mocchetti I: **Gangliosides Prevent Excitotoxicity Through Activation of TrkB Receptor.** *Neurotox Res* 2002, **4**:225-234.

Barnes S, Sfakianos J, Coward L, Kirk M: **Soy isoflavonoids and cancer prevention. Underlying biochemical and pharmacological issues.** *Adv Exp Med Biol* 1996, **401**:87-100.

Barrier L, Ingrand S, Piriou A, Touzalin A, Fauconneau B: **Lactic acidosis stimulates ganglioside and ceramide generation without sphingomyelin hydrolysis in rat cortical astrocytes.** *Neurosci Lett* 2005, **385**:224-229.

Baur JA, Sinclair DA: **Therapeutic potencial of resveratrol: the in vivo evidence.** *Nat Rev Drug Discov* 2006, **5**:493-506.

Belcher SM, Zsarnovszky A: **Estrogenic Actions in the Brain: Estrogen, Phytoestrogens, and Rapid Intracellular Signaling Mechanisms.** *J Pharmacol Exp Ther* 2001, **299**:408-414.

Biraboneye AC, Madonna S, Laras Y, Krantic S, Maher P, Kraus JL: **Potential neuroprotective drugs in cerebral ischemia: new saturated and polyunsaturated lipids coupled to hydrophilic moieties: synthesis and biological activity.** *J Med Chem* 2009, **52**:4358-4369.

Boonocore G, Perrone S: **Biomarkers of hypoxic brain injury in the neonate.** *Clin Perinatol* 2004, **31**:107-116.

Campos-Esparza MR, SánchezGómez MV, Matute C: **Molecular mechanisms of neuroprotection by two natural antioxidant polyphenols.** *Cell Calcium* 2009, **45**:358–368.

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

Cechetti F, Rhod A, Simão F, Santin K, Salbego C, Netto CA, Siqueira IR: **Effect of treadmill exercise on cell damage in rat hippocampal slices submitted to oxygen and glucose deprivation.** *Brain Res* 2007, **1157**:121-125.

Chen X, Chi S, Liu M, Yang W, Wei T, Qi Z, Yang F: **Inhibitory effect of ganglioside GD1b on K⁺ current in hippocampal neurons and its involvement in apoptosis suppression.** *J Lipid Res* 2005, **46**:2580–2585.

Cimarosti H, O'Shea RD, Jones NM, Horn AP, Simão F, Zamin LL, Nassif M, Frozza R, Netto CA, Beart PM, Salbego C: **The effects of estradiol on estrogen receptor and glutamate transporter expression in organotypic hippocampal cultures exposed to oxygen--glucose deprivation.** *Neurochem Res* 2006, **31**:483-490.

Cimarosti H, Rodnight R, Tavares A, Paiva R, Valentin L, Rocha E, Salbego CG: **An investigation of neuroprotective effect of lithium in organotypic slices culture of rat hippocampus exposed to oxygen and glucose deprivation.** *Neurosci Lett* 2001, **315**:33-36.

Cimarosti H, Siqueira IR, Zamin LL, Nassif M, Balk R, Frozza R, Dalmaz C, Netto CA, Salbego C: **Neuroprotection and protein damage prevention by estradiol**

replacement in rat hippocampal slices exposed to oxygen-glucose deprivation. *Neurochem Res* 2005, **4**:583-589.

Cooke GM: **A review of the animal models used to investigate the health benefits of soy isoflavones.** *J AOAC Int* 2005, **89**:1215-27.

Cunha GM, Moraes RA, Moraes GA, França MCJr, Moraes MO, Viana GS: **Nerve growth factor, ganglioside and vitamin E reverse glutamate cytotoxicity in hippocampal cells.** *Eur J Pharmacol* 1999, **367**:107-112.

Das S, Fraga CG, Das DK: **Cardioprotective effect of resveratrol via HO-1 expression involves p38 map kinases and PI-3-kinase signaling, but does not involve NFkappaB.** *Free Radic Res* 2005, **40**:1066-1075.

De Salvia R, Festa F, Ricordy R, Perticone P, Cozzi R: **Resveratrol affects in a different way primary versus fixed DNA damage induced by H(2)O(2) in mammalian cells *in vitro*.** *Toxicol Lett* 2002, **135**:1-9.

Denis L, Morton MS, Griffiths K: **Diet and its preventive role in prostatic disease.** *Eur Urol* 1999, **35**:377-87.

Dickson DW: **Neuropathology of non-Alzheimer degenerative disorders.** *Int J Clin Exp Pathol* 2010, **3**:1-23.

Donnan GA, Fisher M, Macleod M, Davis SM: **Stroke.** *Lancet* 2008, **371**:1612–1623.

Doré S: **Unique Properties of Polyphenol Stilbenes in the Brain: More than Direct Antioxidant Actions; Gene/Protein Regulatory Activity.** *Neurosignals* 2005, **14**:61–70.

Duchemin AM, Qun R, Lili M, Norton HN, Hadjiconstantinou M: **GM1 ganglioside induces phosphorylation and activation of Trk and Erk in brain.** *J Neurochem* 2002, **81**:696–707.

Duchemin AM, Qun R, Norton HN, Hadjiconstantinou M: **GM1-induced activation of phosphatidylinositol 3-kinase: involvement of Trk receptors.** *J Neurochem* 2008, **104**:1466-1477.

Duncan AM, Phipps WR, Kurzer MS: **Phyto-oestrogens.** *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2003, **17**:253-271.

Embrapa Soja: http://www.cnpso.embrapa.br/index.php?op_page=22&. Acessado em 20 maio de 2010.

Faller ALK, Fialho E: **Disponibilidade de polifenóis em frutas e hortaliças consumidas no Brasil.** *Rev Saúde Pública* 2009, **43**:211-218.

Fighera MR, Bonini JS, de Oliveira TG, Frussa-Filho R, Rocha JBT, Dutra-Filho CS, Rubin MA, Mello CF: **GM1 ganglioside attenuates convulsions and thiobarbituric acid reactives substances production induced by the intrastriatal injection of methylmalonic acid.** *Int J Biochem & Cell Biol* 2003, **35**:465-473.

Fighera MR, Bonini JS, Frussa-Filho R, Dutra-Filho CS, Hagen ME, Rubin MA, Mello CF: **Monosialoganglioside increases catalase activity in cerebral cortex of rats.** *Free Rad Res* 2004, **38**:495-500.

Fighera MR, Royes RFF, Furian AF, Oliveira MS, Fiorenza NG, Frussa-Filho R, Petry JC, Coelho RC, Mello CF: **GM1 ganglioside prevents seizures, Na⁺, K⁺ATPase activity inhibition and oxidative stress induced by glutaric acid and pentilenotetrazol.** *Neurobiol Dis* 2006, **22**:611-623.

Fontella FU, Cimarosti H, Crema LM, Thomazi AP, Leite MC, Salbego C, Gonçalves CA, Wofchuk S, Dalmaz C, Netto CA: **Acute and repeated restraint stress influences cellular damage in rat hippocampal slices exposed to oxygen and glucose deprivation.** *Brain Res Bull* 2003, **65**:443-450.

Frezza RL, Horn AP, Hoppe JB, Simão F, Gerhardt D, Comiran RA, Salbego CG: **A comparative study of beta-amyloid peptides Abeta1-42 and Abeta25-35 toxicity in organotypic hippocampal slice cultures.** *Neurochem Res* 2009, **34**:295-303.

Gähwiler BH: **Organotypic monolayer cultures of nervous tissue.** *Neurosci Methods* 1981, **4**:329-342.

Gao ZB, Chen XQ, Hu GY: **Inhibition of excitatory synaptic transmission by trans-resveratrol in rat hippocampus.** *Brain Res* 2006, **1111**:41-47.

Gebhardt R: ***In vitro* screening of plant extracts and phytopharmaceuticals: novel approaches for the elucidation of active compounds and their mechanisms.** *Planta med* 2000, **66**:99-105.

Ghisleni G, Porciúncula LO, Cimarosti H, Batista T, Rocha J, Salbego CG, Souza DO: **Diphenyl diselenide protects rat hippocampal slices submitted to oxygen-glucose deprivation and diminishes inducible nitric oxide synthase immunocontent.** *Brain Res* 2003, **986**:196-199.

Ghosh D, Scheepens A: **Vascular action of polyphenols.** *Mol Nutr Food Res* 2009, **53**:322–331.

Hakomori S: **Glycosphingolipids in cellular interaction, differentiation, and oncogenesis.** *Ann Rev Biochem* 1981, **50**:733-64.

Hakomori SI: **Bifunctional Role of Glycosphingolipids: modulators for transmembrane signaling and mediators for cellular interactions.** *J Bio Chem* 1990, **256**:18713-18716.

Halliwell B, Gutteridge JC: **Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview.** *Methods Enzymol* 1990, **186**:1-63.

Hicks D, Heidinger V, Mohand-Said S, Sahel J, Dreyfus H: **Growth Factors and Gangliosides as Neuroprotective Agents in Excitotoxicity and Ischemia.** *Gen Pharmac* 1998, **30**:265-273.

Higashi H, Omori A, Yamagata T: **Calmodulin, a gangliosideo-binding protein: binding of gangliosides to calmodulin in the presence of calcium.** *J Biol Chem* 1992, **267**:9831-9838.

Hoffman, G: **Seeing Is Believing: Use of Antibodies in Immunocytochemistry and *In situ* Hybridization.** In *Short Course II of SfN's 38th Annual Meeting*: 15-19 November 2008; Washington, DC. Society for Neuroscience; 2008.

Hoppe JB, Frozza RL, Horn AP, Comiran RA, Bernardi A, Campos MM, Battastini AM, Salbego C: **Amyloid-beta neurotoxicity in organotypic culture is attenuated by melatonin: involvement of GSK-3beta, tau and neuroinflammation.** *J Pineal Res* 2010, **48**:230-238.

Horn AP, Gerhardt D, Geyer AB, Valentim LM, Cimarosti H, Tavares A, Horn F, Lenz G, Salbego CG: **Cellular death in hippocampus in response to PI3-k pathway inhibition of oxygen and glucose deprivation.** *Neurochem Res* 2005, **30**:355- 361.

Hsu M, Sik A, Gallyas F, Horváth F, Buzsáki G: **Short-term and long term changes in the postischemic hippocampus.** *Ann N Y Acad Sci* 1994, **743**:121-139.

Huang SS, Tsai MC, Chih CL, Hung LM, Tsai SK: **Resveratrol reduction of infarct size in Long-Evans rats subjected to focal cerebral ischemia.** *Life Sci* 2001, **69**:1057-1065.

Islam F, Hasan M, Saxena K: **Isolation and estimation of gangliosides in discrete regions of the forebrain: effects of estrogen on regional lipid profiles.** *Exp Pathol* 1986, **29**:159-164.

Jang JH, Surh YJ: **Protective effect of resveratrol on beta-amyloid-induced oxidative PC12 cell death.** *Free Radic Biol Med* 2003, **34**:1100-1110.

Jang JH, Surh YJ: **Protective effects of resveratrol on hydrogen peroxide-induced apoptosis in rat pheochromocytoma (PC12) cells.** *Mutat Res* 2001, **496**:181-190.

Jin Y, Wu H, Cohen EM, Wei J, Jin H, Prentice H, Wu J: **Genistein and daidzein induce neurotoxicity at high concentrations in primary rat neuronal cultures.** *J Biomed Sci* 2007, **14**:275-284.

Kajta M, Domin H, Gryniewicz G, Lanson W: **Genistein inhibits glutamate-induced apoptotic processes in primary neuronal cell cultures: an involvement of aryl hydrocarbon receptor and estrogen receptor/glycogen synthase kinase-3 β intracellular signaling pathway.** *Neuroscience* 2007, **145**:592-604.

Kim H, Xia H, Li L, Gewin J: **Attenuation of neurodegeneration-relevant modifications of brain proteins by dietary soy.** *Biofactors* 2000, **12**:243-250.

Kim JW, Jin YC, Kim YM, Rhie S, Kim HJ, Seo HG, Lee JH, Ha YL, Chang KC: **Daidzein administration *in vivo* reduces myocardial injury in a rat ischemia/reperfusion model by inhibiting NF- κ B activation.** *Life Sci* 2009, **84**: 227-234.

Klinge CM, Blanquenship KA, Risinger KE, Bhatnagar S, Noisin EL, Sumanasekera WK, Zhao L, Brey DM, Keynton RS: **Resveratrol and estradiol rapidly activate MAPK signaling through estrogen receptor alpha and beta in endothelial cells.** *Biol Chem* 2005, **280**:7460-7468.

Konrath EL, Santin K, Nassif M, Latini A, Henriques A, Salbego C: **Antioxidant and pro-oxidant properties of boldine on hippocampal slices exposed to oxygen-glucose deprivation *in vitro*.** *Neurotoxicology* 2008, **6**:1136-1140.

Krajnc D, Wemlinger TA, Neff NH, Hadjiconstantinou M: **Neonatal hypoxia: early neurotransmitter responses and the consequences of treatment with GM1 ganglioside.** *J Pharma Exp Ther* 1994, **271**:1299-1305.

Kreutz F: **Efeito do peptídeo beta-amilóide sobre a biossíntese de gangliosídeos e avaliação da atividade neuroprotetora do GM1.** Dissertação apresentada no PPGCB: Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Disponível em: <http://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/22065>, 2010.

Kurzer MS, Xu X: **Dietary phytoestrogens.** *Annu Rev Nutr* 1997, **17**:353-381.

Kwak DH, Kim, SM, Lee DH, Kim JS, Kim SM, Lee SU, Jung KY, Seo BB, Choo YK: **Differential expression patterns of gangliosides in the ischemic cerebral cortex produced by middle cerebral artery occlusion.** *Mol Cells* 2005, **20**:354-360.

Laake JH, Haug FM, Wieloch T, Ottersen OP: **A simple in vitro model of ischemia based on hippocampal slice cultures and propidium iodide fluorescence.** *Brain Res Prot* 1999, **4**:173-184.

Lake BD, Goodwin HJ: **Lipids.** In *Chromatographic and Eletrophoretic Techniques. Paper and Thin Layer Chromatography*, volume 1. William Heinemann Medical Bookes Ltd, London; 1976:345-366.

Lakhan SE, Kiechgessner A, Hofer M: **Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches.** *J Transl Med* 2009, **7**:79.

Langcake P, Pryce CA: **The production of resveratrol by Vitis vinifera and others members of Vitaceae as a response to infection or injury.** *Phisiol Plant Path* 1976, **9**:77-85.

Lazzaro A, Seren MS, Koga T, Zanoni T, Schiavo N, Manev H: **GM1 reduces infarct volume after focal cerebral ischemia.** *Exp Neurol* 1994, **125**:278-285.

Ledeen RW: **Biology of gangliosides: neuritogenic and neuronotrophic properties.** *J Neurosc Res* 1984, **12**:147-159.

Ledeen RW: **Ganglioside and distribution: are they localized at the nerve ending?** *J Supramol Estruc* 1978, **8**:1-17.

Lee DH, Koo DB, Ko K, Ko K, Kim SM, Jung JU, Ryu JS, Jin JW, Yang HJ, Do SI, Jung KY, Choo YK: **Effects of daunorubicin on ganglioside expression and neuronal differentiation of mouse embryonic stem cells.** *Biochem Biophys Res Commun* 2007, **362**:313-318.

Lee YB, Lee HJ, Won MH, Hwang IK, Kang TC, Lee JY, Nam SY, Kim KS, Kim E, Cheon SH, Sohn HS: **Soy isoflavones improve spatial delayed matching-to-place performance and reduce cholinergic neuron loss in elderly male rats.** *J Nutr* 2004, **134**:1827-1831.

Leonard SS, Xia C, Jiang BH, Stinefelt B, Klandorf H, Harris GK, Shi X: **Resveratrol scavengers reactive oxygen species of effects radical-induced cellular responses.** *Biochem Biophys Res Commun* 2003, **309**:1017-1026.

Liang J, Tian Y, Fu L, Wang T, Li H, Wang P, Han R, Zhang J, Skibsted LH: **Daidzein as a Antioxidant of Lipid: Effects of the Microenvironment in Relation to Chemical Structure.** *J Agric Food Chem* 2008, **56**:10376-10383.

Linford NJ, Dorsa DM: **17 β -Estradiol and the phytoestrogen genistein attenuate neuronal apoptosis induced by the endoplasmatic reticulum calcium-ATPase inhibitor thapsigargin.** *Steroids* 2002, **67**:1029-1040.

Lipton P: **Ischemic cell death in brain neurons.** *Physiol Rev* 1999, **79**:1431-1568.

Lo EH, Dalkara T, Moskowitz MA: **Mechanisms, Challenges and Opportunities in Stroke.** *Nat Rev Neurosci* 2003, **4**:399-415.

Losa GA: **Resveratrol modulates apoptosis and oxidation in human blood mononuclear cells.** *Eur J Clin Invest* 2003, **33**:818-823.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: **Protein measurement with the Folin phenol reagent.** *J Biol Chem* 1951, **193**:265-267

Maccioni HJF, Daniotti JL, Martina JA: **Organization of ganglioside synthesis in the Golgi apparatus.** *Biochem. Biophys. Acta* 1999, **1437**:101-118.

Maccioni HJ, Giraudo CG, Daniotti JL: **Understanding the stepwise synthesis of glycolipids.** *Neurochem Res* 2002, **27**:629-636.

Macklis JD, Madison RD: **Progressive incorporation of propidium iodide in culture mouse neurons correlates with declining electrophysiological status: A fluorescence scale of membrane integrity.** *J Neurosci Meth* 1990, **31**:43-46.

Mahadik SP, Hawver DB, Hungund BL, Li YS, Karpiak SE: **GM1 ganglioside treatment after global ischemia protects changes in membrane fatty acids and properties of Na⁺, K⁺, ATPase and Mg²⁺ ATPase.** *J Neurosc Res* 1989, **24**:402-412.

Mahadik SP, Makar TK, Murthy JN, Ortiz A, Wakade CG, Karpiak SE: **Temporal changes in superoxido dismutase, glutathiona peroxidase, and catalase levels**

in primary and peri-ischemic tissue. Monosialganglioside (GM1) treatments effects. *Mol Chem Neurophat* 1993, **18**:1-14.

Maulik N, Das DK, Gogineni M, Cordis GA, Avrova N, Denisova N: **Reduction of myocardial ischemic reperfusion injury by sialylated glycosphingolipids, gangliosides.** *J Cardiovasc Pharmacol* 1993, **22**:74-81.

Michael KM, Shaughnessy M: **Stroke prevention and management in older adults.** *J Cardiovas Nurs* 2006, **21**:21-26.

Ministério da Saúde Brasil (2008). Saúde Brasil 2007 – Uma análise da situação da Saúde: Perfil da mortalidade do brasileiro. Brasília, 06 novembro de 2008. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/coletiva.saude.061008.pdf>. Acessado em 12 de abril de 2010.

Mo L, Ren Q, Duchemin AM, Neff NF, Hadjiconstantinou M: **GM1 and ERK signaling in the aged brain.** *Brain Res* 2005, **1054**:125-134.

Mocchetti I: **Exogenous gangliosides, neuronal plasticity and repair, and the neurotrophins.** *Cell Mol Life Sci* 2005, **62**:2283-2294.

Mokni M, Elkahoui S, Limam F, Amri M, Aouani E: **Effect of resveratrol on antioxidant enzyme activities in the brain of healthy rat.** *Neurochem Res* 2007, **32**:981-987.

Mullen RJ, Buck CR, Smith AM: **NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates.** *Eur J Pharmacol.* 1999, **367**:107-112.

Muller D, Buchs PA, Stoppini L: **Time course of synaptic development in hippocampal organotypic cultures.** *Dev Brain Res* 1998, **71**:93-100.

Mutoh T, Tokuda A, Miyadai T, Hamaguchi M, Fujiki N: **Ganglioside GM1 binds to the Trk protein and regulates receptor function.** *Cell Bio* 1995, **92**:5087-5091.

Nakagawa K, Adachi J, Wong MCY, Euno Y: **Protective Effect of daidzein against Acute Ethanol-induced Lipid Peroxidation in Rat Jejunum.** *Kobe J Med Sci* 2006, **52**:141-149.

Nassif M, Hoppe J, Santin K, Frozza R, Zamin LL, Simão F, Horn AP, Salbego C: **Beta-amyloid peptide toxicity in organotypic hippocampal slice culture involves Akt/PKB, GSK-3beta, and PTEN.** *Neurochem Int* 2007, **50**:229-235.

Noraberg J, Kristensen BW, Zimmer J: **Markers of neuronal degeneration in organotypic slice cultures.** *Brain Res Prot* 1999, **3**:278-290.

Nores GA, Mizutamari RK, Kremer DM: **Chromatographic tank designed to obtain highly reproducible high-performance thin-layer chromatograms of gangliosides and neutral glycosphingolipids.** *J Chromatogr A* 1994, **686**:155-157.

Okubo S, Tanabe Y, Takeda K, Kitayama M, Kanemitsu S, Kukreja RC, Takekoshi N: **Pretreatment with Tyrosine Kinase Inhibitor Attenuates the reduction of Apoptosis 24 h after Ischemic Preconditioning.** *Jpn J Physiol* 2004, **54**:143-151.

Park YK, Aguiar CL, Alencar SM, Mascarenhas HAA, Scamparini ARP: **Avaliação do teor de isoflavonas em soja brasileira.** *Ciência y Tecnologia Alimentaria* 2001, **3**:156-160.

Phillis JW, O'Regan MH: **GM1 ganglioside inhibits ischemia release of amino acid neurotransmitters from rat cortex.** *NeuroReport* 1995, **6**:2010-2012.

Pike LJ: **Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function.** *J Lipid Res* 2006, **47**:1597-1598.

Pitto M, Mutoh T, Kuriyama M, Ferraretto A, Palestini P, Masserini M: **Influence of endogenous GM1 ganglioside on TrkB activity, in cultured neurons.** *FEBS Letters* 1998, **439**:93-96.

Porciúncula LO, Rocha JB, Cimarosti H, Vinadé L, Salbego CG, Souza DO: **Neuroprotective effect of ebselen on rat hippocampal slices submitted to oxygen-glucose deprivation: correlation with immunocontent of inducible nitric oxide synthase.** *Neurosci Lett* 2003, **346**:101-104.

Price D: **New order from neurological disorders.** *Nature* 1999, **399**:A3-A5.

Pringle AK, Iannotti F, Wilde GJC, Chad JE, Seeley PJ, Sundstrom LE: **Neuroprotection by both NMDA and non-NMDA receptor antagonists in *in vitro* ischemia.** *Brain Res* 1997, **755**:36-46.

Rabin SJ, Bachis A, Mocchetti I: **Gangliosides Activate Trk Receptors by Inducing the Release of Neurotrophins.** *J Bio Chem* 2002, **277**:49466-49472.

Ramirez MR, Muraro F, Zylbersztejn DS, Abel CR, Arteni NS, Lavinsky D, Netto CA, Trindade VM: **Neonatal hypoxia-ischemia reduces ganglioside, phospholipid and cholesterol contents in the rat hippocampus.** *Neurosci Res* 2003, **46**:339-347.

Renaud S, Lorget M: **Wine, alcohol, platelets, and The French Paradox for coronary heart disease.** *Lancet* 1992, **339**:1523-1526.

Schmidt-Kastner R, Freund TF: **Selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia.** *Neuroscience* 1991, **4**:599-636.

Schreiber SS, Baudry M: **Selective neuronal vulnerability in the hippocampus – a role for gene expression.** *Trends Neurosci* 1995, **18**:446-451.

Schreihof DA, Redmond L: **Soy phytoestrogens are neuroprotective against stroke-like injury *in vitro*.** *Neuroscience* 2009, **158**:602-609.

Scopel D, Fochesatto C, Cimarosti H, Rabbo M, Belló-Klein A, Salbego C, Netto CA, Siqueira IR: **Exercise intensity influences cell injury in rat hippocampal slices exposed to oxygen and glucose deprivation.** *Brain Res Bull* 2006, **71**:155-159.

Siemann EH, Creasy LL: **Concentration of phytoalexin resveratrol in wine.** *Am J Enol Vitic* 1992, **43**:49-52.

Simão F, Zamin LL, Frozza R, Nassif M, Horn AP, Salbego CG: **Protective profile of oxcarbazepine against oxygen-glucose deprivation in organotypic hippocampal slice culture could involve PI3K cell signaling pathway.** *Neurol Res* 2009, **31**:1044-1048

Simons K, Ikonen E: **Functional rafts in cell membranes.** *Nature* 1997, **387**:569-72.

Sinha K, Chaudhary G, Gupta YK: **Protective effect of resveratrol against oxidative stress in middle cerebral artery occlusion model of stroke in rats.** *Life Sci* 2002, **71**:655-665.

Siqueira IR, Cimarosti H, Fochesatto C, Nunes DS, Salbego C, Elisabetsky E, Netto CA: **Neuroprotective effects of *Ptychopetalum olacoides* Bentham (Olacaceae) on oxygen and glucose deprivation induced damage in rat hippocampal slices.** *Life Sci* 2004-a, **75**:1897-906.

Siqueira IR, Cimarosti H, Fochesatto C, Salbego C, Netto CA: **Age-related susceptibility to oxygen and glucose deprivation damage in rat hippocampal slices.** *Brain Res* 2004-b, **1025**:226-230.

Sirtori CR, Arnoldi A, Johnson SK: **Phytoestrogens: end of a tale?** *Ann Med* 2005, **37**:423-438.

Soares DG, Andrezza AC, Salvador M: **Sequestering ability of butylated hydroxytoluene, propyl gallate, resveratrol, and vitamins C and E against ABTS, DPPH, and hydroxyl free radicals in chemical and biological systems.** *J Agric Food Chem* 2003, **51**:1077-1080.

Soleas GJ, Diamandis EP, Goldberg DM: **Wine as a biological fluid: history, production, and role in disease prevention.** *Clin Lab Anal* 1997,**11**:287-313.

Souto AA, Carneiro MC, Seferin M, Senna MJH, Conz A, Gobbi K: **Determination of trans-Resveratrol Concentrations in Brazilian Red Wines by HPLC.** *J Food Compost Anal* 2001, **14**:441-445.

Stoppini L, Buchs P-A, Muller D: **A simple method for organotypic cultures of nervous tissue.** *J Neurosci Meth* 1991, **37**:173-186.

Strasser U, Fischer G: **Quantitative measurement of neuronal degeneration in organotypic hippocampal cultures after combined oxygen/glucose deprivation.** *J Neurosci Meth* 1995, **57**:177-186.

Sun AY, Wang Q, Simonyi A, Sun GY: **Botanical Phenolics and Brain Health.** *Neuromol Med* 2008, **10**:259–274.

Svennerholm L, Brane G, Darlsson I, Leckman A, Ramstrom I, Wikkelso C: **Alzheimer disease- effect of continuous intracerebroventricular treatment with GM1 ganglioside and a systematic activation programme.** *Dement Geriatr Cogn Disord* 2002, **14**:128-136.

Svennerholm L: **Chromatographic separation of human brain gangliosides.** *J Neurochem* 1963, **10**:613-623.

Svennerholm L: **Composition of gangliosides from human brain.** *Nature* 1956, **177**:524-552.

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

Svennerholm L: **Quantitative estimation of sialic acids a colometric resorcinol-hydrochloric acid method.** *Biochim Biophys Acta* 1957, **24**:604-611.

Tagliari B, Zamin LL, Salbego CG, Netto CA, Wyse AT: **Homocysteine increases neuronal damage in hippocampal slices receiving oxygen and glucose deprivation.** *Metab Brain Dis* 2006-a, **21**:273-278.

Tagliari B, Zamin LL, Salbego CG, Netto CA, Wyse AT: **Hyperhomocysteinemia increases damage on brain slices exposed to in vitro model of oxygen and glucose deprivation: prevention by folic acid.** *Int J Dev Neurosci* 2006-b, **24**:285-291.

Takada K, Shimizu J, Kusunoki S: **Apoptosis of primary sensory neurons in GD1b-induced sensory ataxic neuropathy.** *Exp Neurol* 2008, **209**:279-283.

Tavares A, Cimarosti H, Valentim L, Salbego C: **Profile of phosphoprotein labelling in organotypic slice cultures of rat hippocampus.** *Neuroreport* 2001, **12**:2705–2709.

Tettamanti G, Riboni L: **Gangliosides and modulation of the function of neural cells.** *Adv Lipid Res* 1993, **25**:235-267.

Tettamanti G: **Ganglioside/glycosphingolipid turnover: New concepts.** *Glycoconj J* 2004, **20**:301–317.

Thomazi AP, Boff B, Pires TD, Godinho G, Battú CE, Gottfried C, Souza DO, Salbego C, Wofchuk ST: **Profile of glutamate uptake and cellular viability in hippocampal slices exposed to oxygen and glucose deprivation: developmental aspects and protection by guanosine.** *Brain Res* 2008, **1188**:233-240.

Trindade VM, Daniotti JL, Raimondi L, Chazan R, Netto CA, Maccioni HJ: **Effects of neonatal hypoxia/ischemia on ganglioside expression in the rat hippocampus.** *Neurochem Res* 2001, **26**:591-597.

Valentim LM, Geyer AB, Tavares A, Cimarosti H, Worm PV, Rodnight R, Netto CA, Salbego CG: **Effects of global cerebral ischemia and preconditioning on heat shock protein 27 immunocontent and phosphorylation in rat hippocampus.** *Neuroscience* 2001, **107**:43-49.

Valentim LM, Rodnight R, Geyer AB, Horn AP, Tavares A, Cimarosti H, Netto CA, Salbego CG: **Changes in heat shock protein 27 phosphorylation and immunocontent in response to preconditioning to oxygen and glucose deprivation in organotypic hippocampal cultures.** *Neurosciense* 2003, **118**:379-386.

Willison HJ, Yuki N: **Peripheral neuropathies and anti-glycolipid antibodies.** *Brain* 2002, **125**:2591–2625.

Wilot LC, Bernardi A, Frozza RL, Marques AL, Cimarosti H, Salbego C, Rocha E, Battastini AM: **Lithium and valproate protect hippocampal slices against ATP-induced cell death.** *Neurochem Res* 2007, **32**:1539-1546.

Xiang Z, Hrabetova G, Moskowitz SI, Casaccio-bonnefil P, Young SR, Nimmrich VC, Tiedge H, Eineheber S, Karnup S, Bianchi R, Bergold PJ: **Long-term maintenance of mature hippocampal slices in vitro.** *J Neuroscience Meth* 2000, **98**:145-154.

Yáñez M, Fraiz N, Cano E, Orallo F: **Inhibitory effects of cis- and trans-resveratrol on noradrenaline and 5-hydroxytryptamine uptake and on monoamine oxidase activity.** *Biochem Biophys Res Commun* 2006, **344**:688-695.

Yang G, Kitakawa K, Ohtsuki T, Kuwabara K, Mabuchi T, Yagita Y, Takazawa K, Tanaka T, Yanagihara T, Hori M, Matsumoto M: **Regional difference of neuronal vulnerability in the murine hippocampus after transient forebrain ischemia.** *Brain Res* 2000, **870**:195-198.

Yin J, Hashimoto A, Izawa M, Miyazaki K, Chen GY, Takematsu H, Kozutsumi Y, Suzuki A, Furuhata K, Cheng FL, Lin CH, Sato C, Kitajima K, Kannagi R: **Hypoxic culture induces expression of sialin, a sialic acid transporter, and cancer-associated gangliosides containing non-human sialic acid on human cancer cells.** *Cancer Res* 2006, **66**:2937-2945.

Yousef MI, Kamel KI, Esmail AM, Baghdadi HH: **Antioxidant actives and lipid lowering effects of isoflavone in male rabbits.** *Food Chem Toxicol* 2004, **42**:1497-1503.

Yu RK, Bieberich E, Xia T, Zeng G: **Regulation of ganglioside biosynthesis in the nervous system.** *J Lipid Res* 2004, **45**:783-793.

Yu RK, Nakatani Y, Yanagisawa M: **The role of glycosphingolipid metabolism in the developing brain.** *J Lipid Res* 2009, **50**(Suppl):440-445.

Zamin LL, Dillenburg-Pilla P, Argenta-Comiran R, Horn AP, Simao F, Nassif M, Gerhardt D, Frozza RL, Salbego CG: **Protective effect of resveratrol against**

oxygen-glucose deprivation in organotypic hippocampal slice cultures: Involvement of PI3-K pathway. *Neurobiol Dis* 2006, **24**:170-182.

Zhan S, Ho SC: **Meta-analysis of the effects of soy protein containing isoflavones on the lipid profile.** *Am J Clin Nutri* 2005, **81**:397-408.

Zhao L, Chen Q, Brinton RD: **Neuroprotective and Neurotrophic Efficacy of Phytoestrogens in Cultured Hippocampal Neurons.** *Exp Bio Med* 2002, **227**:509-519.

8. ANEXOS

Instructions for *Journal of Biomedical Science* authors

General information

Submission process

Manuscripts must be submitted by one of the authors of the manuscript, and should not be submitted by anyone on their behalf. The submitting author takes responsibility for the article during submission and peer review.

To facilitate rapid publication and to minimize administrative costs, *Journal of Biomedical Science* accepts only [online submission](#).

Files can be submitted as a batch, or one by one. The submission process can be interrupted at any time - when users return to the site, they can carry on where they left off.

See below for examples of acceptable word processor and graphics file formats. Additional files of any type, such as movies, animations, or original data files, can also be submitted as part of the publication.

During submission you will be asked to provide a cover letter. Please use this to explain why your manuscript should be published in the journal and to elaborate on any issues relating to our editorial policies detailed in the instructions for authors.

Assistance with the process of manuscript preparation and submission is available from the customer support team (info@biomedcentral.com).

We also provide a collection of links to useful tools and resources for scientific authors, on our [Tools for Authors](#) page.

Publication and peer review processes

Journal of Biomedical Science uses online peer review to speed up the publication process. The time taken to reach a final decision depends on whether reviewers request revisions, and how quickly authors are able to respond.

Once an article is accepted, it is published in *Journal of Biomedical Science* immediately as a provisional PDF file. The paper will subsequently be published in both fully browseable web form, and as a formatted PDF. The article will then be available through *Journal of Biomedical Science*, BioMed Central and PubMed Central, and will also be included in PubMed.

The ultimate responsibility for any decision lies with the Editor-in-Chief, to whom any appeals against rejection should be addressed.

No article processing charge needs to be paid by the author

The publication costs for *Journal of Biomedical Science* are covered by the journal, so authors do not need to pay an article processing charge.

Editorial policies

Any manuscripts, or substantial parts of it, submitted to the journal must not be under consideration by any other journal. In general, the manuscript should not have already been published in any journal or other citable form, although it may have been deposited on a preprint server. The journal is willing to consider peer-reviewing manuscripts that are translations of articles originally published in another language. In this case, the consent of the journal in which the article was originally published must be obtained and the fact that the article has already been published must be made clear on submission and stated in the abstract. Further information on duplicate/overlapping publications can be found [here](#). Authors are required to ensure that no material submitted as part of a manuscript infringes existing copyrights, or the rights of a third party. Authors who publish in *Journal of Biomedical Science* retain copyright to their work ([more information](#)). Correspondence concerning articles published in *Journal of Biomedical Science* is encouraged.

Submission of a manuscript to *Journal of Biomedical Science* implies that all authors have read and agreed to its content, and that any experimental research that is reported in the manuscript has been performed with the approval of an appropriate ethics committee. Research carried out on humans must be in compliance with the [Helsinki Declaration](#), and any experimental research on animals must follow internationally recognized guidelines. A statement to this effect must appear in the Methods section of the manuscript, including the name of the body which gave approval, with a reference number where appropriate. Informed consent must also be documented. Manuscripts may be rejected if the editorial office considers that the research has not been carried out within an ethical framework, e.g. if the severity of the experimental procedure is not justified by the value of the knowledge gained.

Journal of Biomedical Science's publisher, BioMed Central, has a legal responsibility to ensure that its journals do not publish material that infringes copyright, or that includes libellous or defamatory content. If, on review, your manuscript is perceived to contain potentially libellous content the journal Editors, with assistance from the publisher if required, will work with authors to ensure an appropriate outcome is reached.

Generic drug names should generally be used. When proprietary brands are used in research, include the brand names in parentheses in the Methods section.

We ask authors of *Journal of Biomedical Science* papers to complete a [declaration of competing interests](#), which should be provided as a separate section of the manuscript, to follow the Acknowledgements. Where an author gives no competing interests, the listing will read 'The author(s) declare that they have no competing interests'. Much has been written about competing interests (or conflict of interest, as other journals call it) within scientific research, but the following articles provide some background:

R Smith: Beyond conflict of interest. *BMJ* 1998, 317 :291-292

R Smith: Making progress with competing interests. *BMJ* 2002, 325 :1375-1376

CD DeAngelis, PB Fontanarosa, A Flanagan: Reporting financial conflicts of interest and relationships between investigators and research sponsors. *JAMA* 2001, 286 :89-9

K Morin, H Rakatansky, FA Riddick Jr, LJ Morse, JM O'Bannon 3rd, MS Goldrich, P Ray, M Weiss, RM Sade, MA Spillman: Managing conflicts of interest in the conduct of clinical trials. *JAMA* 2002, 287 :78-84

Any 'in press' articles cited within the references and necessary for the reviewers' assessment of the manuscript should be made available if requested by the editorial office.

Submission of a manuscript to *Journal of Biomedical Science* implies that readily reproducible materials described in the manuscript, including all relevant raw data, will be freely available to any scientist wishing to use them for non-commercial purposes. Nucleic acid sequences, protein sequences, and atomic coordinates should be deposited in an appropriate database in time for the accession number to be included in the published article. In computational studies where the sequence information is unacceptable for inclusion in databases because of lack of experimental validation, the sequences must be published as an additional file with the article.

Journal of Biomedical Science also supports initiatives aimed at improving the reporting of biomedical research. We recommend authors refer to the [MIBBI Portal](#) for prescriptive checklists for reporting biological and biomedical research where applicable.

Nucleotide sequences

Nucleotide sequences can be deposited with the [DNA Data Bank of Japan \(DDBJ\)](#), [European Molecular Biology Laboratory \(EMBL/EBI\) Nucleotide Sequence Database](#), or [GenBank](#) (National Center for Biotechnology Information).

Protein sequences

Protein sequences can be deposited with [SwissProt](#) or the [Protein Information Resource \(PIR\)](#).

Structures

Protein structures can be deposited with one of the members of the [Worldwide Protein Data Bank](#). Nucleic Acids structures can be deposited with the [Nucleic Acid Database](#) at Rutgers. Crystal structures of organic compounds can be deposited with the [Cambridge Crystallographic Data Centre](#).

Chemical structures and assays

Structures of chemical substances can be deposited with [PubChem Substance](#). Bioactivity screens of chemical substances can be deposited with [PubChem BioAssay](#).

Microarray data

Where appropriate, authors should adhere to the standards proposed by the [Microarray Gene Expression Data Society](#) and must deposit microarray data in one of the public repositories, such as [ArrayExpress](#), [Gene Expression Omnibus \(GEO\)](#) or the [Center for Information Biology Gene Expression Database \(CIBEX\)](#).

Computational modeling

We encourage authors to prepare models of biochemical reaction networks using the [Systems Biology Markup Language](#) and to deposit the model with the [BioModels database](#), as well as submitting it as an additional file with the manuscript.

Plasmids

We encourage authors to deposit copies of their plasmids as DNA or bacterial stocks with [Addgene](#), a non-profit repository, or [PlasmID](#), the Plasmid Information Database at Harvard.

BioMed Central is a member of the Committee on Publication Ethics (COPE). Authors who have appealed against a rejection but remain concerned about the editorial process can refer their case to COPE. For more information, visit www.publicationethics.org.

BioMed Central endorses the World Association of Medical Editors (WAME) [Policy Statement on Geopolitical Intrusion on Editorial Decisions](#).

Preparing main manuscript text

File formats

The following word processor file formats are acceptable for the main manuscript document:

- Microsoft Word (version 2 and above)
- Rich text format (RTF)
- Portable document format (PDF)
- TeX/LaTeX (use [BioMed Central's TeX template](#))
- DeVice Independent format (DVI)
- Publicon Document (NB)

Users of other word processing packages should save or convert their files to RTF before uploading. Many free tools are available which ease this process.

TeX/LaTeX users: We recommend using [BioMed Central's TeX template and BibTeX stylefile](#). If you use this standard format, you can submit your manuscript in TeX format (after you submit your TEX file, you will be prompted to submit your BBL file). If you have used another template for your manuscript, or if you do not wish to use BibTeX, then please submit your manuscript as a DVI file. We do not recommend converting to RTF.

Note that [figures](#) must be submitted as separate image files, not as part of the submitted DOC/PDF/TEX/DVI file.

Article types

When submitting your manuscript, you will be asked to assign one of the following types to your article:

[Research](#)

[Review](#)

Please read the descriptions of each of the article types, choose which is appropriate for your article and structure it accordingly. If in doubt, your manuscript should be classified as Research, the structure for which is described below.

Manuscript sections for Research articles

Manuscripts for Research articles submitted to *Journal of Biomedical Science* should be divided into the following sections:

- [Title page](#)
- [Abstract](#)
- [Background](#)
- [Methods](#)
- [Results](#)
- [Discussion](#)
- [Conclusions](#)
- [List of abbreviations used](#) (if any)
- [Competing interests](#)
- [Authors' contributions](#)
- [Authors' information](#) (if any)
- [Acknowledgements](#)
- [References](#)

- [Figure legends](#) (if any)
- [Tables and captions](#) (if any)
- [Description of additional data files](#) (if any)

You can [download a template](#) (compatible with Mac and Windows Word 97/98/2000/2003/2007) for your article. For instructions on use, see [below](#).

The **Accession Numbers** of any nucleic acid sequences, protein sequences or atomic coordinates cited in the manuscript should be provided, in square brackets and include the corresponding database name; for example, [EMBL:AB026295, EMBL:AC137000, DDBJ:AE000812, GenBank:U49845, PDB:1BFM, Swiss-Prot:Q96KQ7, PIR:S66116].

The databases for which we can provide direct links are: EMBL Nucleotide Sequence Database ([EMBL](#)), DNA Data Bank of Japan ([DDBJ](#)), GenBank at the NCBI ([GenBank](#)), Protein Data Bank ([PDB](#)), Protein Information Resource ([PIR](#)) and the Swiss-Prot Protein Database ([Swiss-Prot](#)).

Title page

This should list the title of the article, the full names, institutional addresses, and e-mail addresses for all authors. The corresponding author should also be indicated.

Abstract

The abstract of the manuscript should not exceed 350 words and must be structured into separate sections: **Background**, the context and purpose of the study; **Methods**, how the study was performed and statistical tests used; **Results**, the main findings; **Conclusions**, brief summary and potential implications. Please minimize the use of abbreviations and do not cite references in the abstract;

Background

The background section should be written from the standpoint of researchers without specialist knowledge in that area and must clearly state - and, if helpful, illustrate - the background to the research and its aims. The section should end with a very brief statement of what is being reported in the article.

Methods

This should be divided into subsections if several methods are described.

Results and Discussion

The Results and Discussion may be combined into a single section or presented separately. They may also be broken into subsections with short, informative headings.

Conclusions

This should state clearly the main conclusions of the research and give a clear explanation of their importance and relevance. Summary illustrations may be included.

List of abbreviations

If abbreviations are used in the text, either they should be defined in the text where first used, or a list of abbreviations can be provided, which should precede the competing interests and authors' contributions.

Competing interests

A competing interest exists when your interpretation of data or presentation of information may be influenced by your personal or financial relationship with other people or organizations. Authors should disclose any financial competing interests but also any non-financial competing interests that may cause them embarrassment were they to become public after the publication of the manuscript.

Authors are required to complete a declaration of competing interests. All competing interests that are declared will be listed at the end of published articles. Where an author gives no competing interests, the listing will read 'The author(s) declare that they have no competing interests'.

When completing your declaration, please consider the following questions:

Financial competing interests

- In the past five years have you received reimbursements, fees, funding, or salary from an organization that may in any way gain or lose financially from the publication of this manuscript, either now or in the future? Is such an organization financing this manuscript? If so, please specify.
- Do you hold any stocks or shares in an organization that may in any way gain or lose financially from the publication of this manuscript, either now or in the future? If so, please specify.
- Do you hold or are you currently applying for any patents relating to the content of the manuscript? Have you received reimbursements, fees, funding, or salary from an organization that holds or has applied for patents relating to the content of the manuscript? If so, please specify.
- Do you have any other financial competing interests? If so, please specify.

Non-financial competing interests

Are there any non-financial competing interests (political, personal, religious, ideological, academic, intellectual, commercial or any other) to declare in relation to this manuscript? If so, please specify.

If you are unsure as to whether you or one of your co-authors has a competing interest, please discuss it with the editorial office.

Authors' contributions

In order to give appropriate credit to each author of a paper, the individual contributions of authors to the manuscript should be specified in this section.

An "author" is generally considered to be someone who has made substantive intellectual contributions to a published study. To qualify as an author one should 1) have made substantial contributions to conception and design, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data; 2) have been involved in drafting the manuscript or revising it critically for important intellectual content; and 3) have given final approval of the version to be published. Each author should have participated sufficiently in the work to take public responsibility for appropriate portions of the content. Acquisition of funding, collection of data, or general supervision of the research group, alone, does not justify authorship.

We suggest the following kind of format (please use initials to refer to each author's contribution): AB carried out the molecular genetic studies, participated in the sequence alignment and drafted the manuscript. JY carried out the immunoassays. MT participated in the sequence alignment. ES participated in the design of the study and performed the statistical analysis. FG conceived of the study, and participated in its design and coordination and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

All contributors who do not meet the criteria for authorship should be listed in an acknowledgements section. Examples of those who might be acknowledged include a person who provided purely technical help, writing assistance, or a department chair who provided only general support.

Authors' information

You may choose to use this section to include any relevant information about the author(s) that may

aid the reader's interpretation of the article, and understand the standpoint of the author(s). This may include details about the authors' qualifications, current positions they hold at institutions or societies, or any other relevant background information. Please refer to authors using their initials. Note this section should not be used to describe any competing interests.

Acknowledgements

Please acknowledge anyone who contributed towards the study by making substantial contributions to conception, design, acquisition of data, or analysis and interpretation of data, or who was involved in drafting the manuscript or revising it critically for important intellectual content, but who does not meet the criteria for authorship. Please also include their source(s) of funding. Please also acknowledge anyone who contributed materials essential for the study.

Authors should obtain permission to acknowledge from all those mentioned in the Acknowledgements.

Please list the source(s) of funding for the study, for each author, and for the manuscript preparation in the acknowledgements section. Authors must describe the role of the funding body, if any, in study design; in the collection, analysis, and interpretation of data; in the writing of the manuscript; and in the decision to submit the manuscript for publication.

References

All references must be numbered consecutively, in square brackets, in the order in which they are cited in the text, followed by any in tables or legends. Reference citations should not appear in titles or headings. Each reference must have an individual reference number. Please avoid excessive referencing. If automatic numbering systems are used, the reference numbers must be finalized and the bibliography must be fully formatted before submission.

Only articles and abstracts that have been published or are in press, or are available through public e-print/preprint servers, may be cited; unpublished abstracts, unpublished data and personal communications should not be included in the reference list, but may be included in the text and referred to as "unpublished data", "unpublished observations", or "personal communications" giving the names of the involved researchers. Notes/footnotes are not allowed. Obtaining permission to quote personal communications and unpublished data from the cited author(s) is the responsibility of the author. Journal abbreviations follow Index Medicus/MEDLINE. Citations in the reference list should contain all named authors, regardless of how many there are.

Examples of the *Journal of Biomedical Science* reference style are shown below. Please take care to follow the reference style precisely; references not in the correct style may be retyped, necessitating tedious proofreading.

Links

Web links and URLs should be included in the reference list. They should be provided in full, including both the title of the site and the URL, in the following format: **The Mouse Tumor Biology Database** [http://tumor.informatics.jax.org/mtbwi/index.do]

***Journal of Biomedical Science* reference style**

Style files are available for use with popular bibliographic management software:

- [BibTeX](#)
- [EndNote style file](#)
- [Reference Manager](#)

Article within a journal

1. Koonin EV, Altschul SF, Bork P: **BRCA1 protein products: functional motifs.** *Nat Genet* 1996, **13**:266-267.

Article within a journal supplement

2. Orengo CA, Bray JE, Hubbard T, LoConte L, Sillitoe I: **Analysis and assessment of ab initio three-dimensional prediction, secondary structure, and contacts prediction.** *Proteins* 1999, **43**(Suppl 3):149-170.

In press article

3. Kharitonov SA, Barnes PJ: **Clinical aspects of exhaled nitric oxide.** *Eur Respir J*, in press.

Published abstract

4. Zvaifler NJ, Burger JA, Marinova-Mutafchieva L, Taylor P, Maini RN: **Mesenchymal cells, stromal derived factor-1 and rheumatoid arthritis [abstract].** *Arthritis Rheum* 1999, **42**:s250.

Article within conference proceedings

5. Jones X: **Zeolites and synthetic mechanisms.** In *Proceedings of the First National Conference on Porous Sieves: 27-30 June 1996; Baltimore*. Edited by Smith Y. Stoneham: Butterworth-Heinemann; 1996:16-27.

Book chapter, or article within a book

6. Schnepf E: **From prey via endosymbiont to plastids: comparative studies in dinoflagellates.** In *Origins of Plastids. Volume 2*. 2nd edition. Edited by Lewin RA. New York: Chapman and Hall; 1993:53-76.

Whole issue of journal

7. Ponder B, Johnston S, Chodosh L (Eds): **Innovative oncology.** In *Breast Cancer Res* 1998, **10**:1-72.

Whole conference proceedings

8. Smith Y (Ed): *Proceedings of the First National Conference on Porous Sieves: 27-30 June 1996; Baltimore*. Stoneham: Butterworth-Heinemann; 1996.

Complete book

9. Margulis L: *Origin of Eukaryotic Cells*. New Haven: Yale University Press; 1970.

Monograph or book in a series

10. Hunninghake GW, Gadek JE: **The alveolar macrophage.** In *Cultured Human Cells and Tissues*. Edited by Harris TJR. New York: Academic Press; 1995:54-56. [Stoner G (Series Editor): *Methods and Perspectives in Cell Biology*, vol 1.]

Book with institutional author

11. Advisory Committee on Genetic Modification: *Annual Report*. London; 1999.

PhD thesis

12. Kohavi R: **Wrappers for performance enhancement and oblivious decision graphs.** *PhD thesis*. Stanford University, Computer Science Department; 1995.

Link / URL

13. **The Mouse Tumor Biology Database** [<http://tumor.informatics.jax.org/mtbwi/index.do>]

Microsoft Word template

Although we can accept manuscripts prepared as Microsoft Word, RTF or PDF files, we have designed a Microsoft Word template that can be used to generate a standard style and format for your article. It can be used if you have not yet started to write your paper, or if it is already written and needs to be put into *Journal of Biomedical Science* style.

[Download the template](#) (Mac and Windows compatible Word 1998/2000) from our site, and save it to your hard drive. Double click the template to open it.

How to use the *Journal of Biomedical Science* template

The template consists of a standard set of headings that make up a *Journal of Biomedical Science* Research manuscript, along with dummy fragments of body text. Follow these steps to create your manuscript in the standard format:

- Replace the dummy text for Title, Author details, Institutional affiliations, and the other sections of the manuscript with your own text (either by entering the text directly or by cutting and pasting from your own manuscript document).
- If there are sections which you do not need, delete them (but check the rest of the Instructions for Authors to see which sections are compulsory).
- If you need an additional copy of a heading (e.g. for additional figure legends) just copy and paste.
- For the references, you may either manually enter the references using the [reference style](#) given, or use bibliographic software to insert them automatically. We provide style files for [EndNote](#) and [Reference Manager](#).

For extra convenience, you can use the template as one of your standard Word templates. To do this, put a copy of the template file in Word's 'Templates' folder, normally C:\Program Files\Microsoft Office\Templates on a PC. The next time you create a new document in Word using the File menu, the template will appear as one of the available choices for a new document.

Preparing illustrations and figures

Figures should be provided as separate files and should not be included in the main text of the submitted manuscript. Each figure should comprise only a single file. There is no charge for the use of color.

Please read our [figure preparation guidelines](#) for detailed instructions on maximising the quality of your [figures](#),

Formats

The following file formats can be accepted:

- **EPS** (preferred format for diagrams)
- **PDF** (also especially suitable for diagrams)
- **PNG** (preferred format for photos or images)
- Microsoft Word (figures must be a single page)
- PowerPoint (figures must be a single page)
- TIFF
- JPEG
- BMP
- CDX (ChemDraw)
- TGF (ISIS/Draw)

Figure legends

The legends should be included in the main manuscript text file immediately following the references, rather than being a part of the figure file. For each figure, the following information should be provided: Figure number (in sequence, using Arabic numerals - i.e. Figure 1, 2, 3 etc); short title of figure (maximum 15 words); detailed legend, up to 300 words.

Please note that it is the responsibility of the author(s) to obtain permission from the copyright

holder to reproduce figures or tables that have previously been published elsewhere.

Preparing tables

Each table should be numbered in sequence using Arabic numerals (i.e. Table 1, 2, 3 etc.). Tables should also have a title that summarizes the whole table, maximum 15 words. Detailed legends may then follow, but should be concise.

Smaller tables considered to be integral to the manuscript can be pasted into the end of the document text file, in portrait format (note that tables on a landscape page must be reformatted onto a portrait page or submitted as additional files). These will be typeset and displayed in the final published form of the article. Such tables should be formatted using the 'Table object' in a word processing program to ensure that columns of data are kept aligned when the file is sent electronically for review; this will not always be the case if columns are generated by simply using tabs to separate text. Commas should not be used to indicate numerical values. Color and shading should not be used.

Larger datasets can be uploaded separately as additional files. Additional files will not be displayed in the final, published form of the article, but a link will be provided to the files as supplied by the author.

Tabular data provided as additional files can be uploaded as an Excel spreadsheet (.xls) or comma separated values (.csv). As with all files, please use the standard file extensions.

Preparing additional files

Although *Journal of Biomedical Science* does not restrict the length and quantity of data in a paper, there may still be occasions where an author wishes to provide data sets, tables, movie files, or other information as additional information. These files can be uploaded using the 'Additional Material files' button in the manuscript submission process.

The maximum file size for additional files is 20 MB each, and files will be virus-scanned on submission.

Any additional files will be linked into the final published article in the form supplied by the author, but will not be displayed within the paper. They will be made available in exactly the same form as originally provided.

If additional material is provided, please list the following information in a separate section of the manuscript text, immediately following the tables (if any):

- File name
- File format (including name and a URL of an appropriate viewer if format is unusual)
- Title of data
- Description of data

Additional datafiles should be referenced explicitly by file name within the body of the article, e.g. 'See additional file 1: Movie1 for the original data used to perform this analysis'.

Formats and uploading

Ideally, file formats for additional files should not be platform-specific, and should be viewable using free or widely available tools. The following are examples of suitable formats.

- Additional documentation

- PDF (Adobe Acrobat)
- Animations
 - SWF (Shockwave Flash)
- Movies
 - MOV (QuickTime)
 - MPG (MPEG)
- Tabular data
 - XLS (Excel spreadsheet)
 - CSV (Comma separated values)

As with figure files, files should be given the standard file extensions. This is especially important for Macintosh users, since the Mac OS does not enforce the use of standard extensions. Please also make sure that each additional file is a single table, figure or movie (please do not upload linked worksheets or PDF files larger than one sheet).

Mini-websites

Small self-contained websites can be submitted as additional files, in such a way that they will be browsable from within the full text HTML version of the article. In order to do this, please follow these instructions:

1. Create a folder containing a starting file called index.html (or index.htm) in the root
2. Put all files necessary for viewing the mini-website within the folder, or sub-folders
3. Ensure that all links are relative (ie "images/picture.jpg" rather than "/images/picture.jpg" or "http://yourdomain.net/images/picture.jpg" or "C:\Documents and Settings\username\My Documents\mini-website\images\picture.jpg") and no link is longer than 255 characters
4. Access the index.html file and browse around the mini-website, to ensure that the most commonly used browsers (Internet Explorer and Firefox) are able to view all parts of the mini-website without problems, it is ideal to check this on a different machine

Compress the folder into a ZIP, check the file size is under 20 MB, ensure that index.html is in the root of the ZIP, and that the file has .zip extension, then submit as an additional file with your article

Style and language

General

Currently, *Journal of Biomedical Science* can only accept manuscripts written in English. Spelling should be US English or British English, but not a mixture.

Gene names should be in italic, but protein products should be in plain type.

There is no explicit limit on the length of articles submitted, but authors are encouraged to be concise. There is no restriction on the number of figures, tables or additional files that can be included with each article online. Figures and tables should be sequentially referenced. Authors should include all relevant supporting data with each article.

Journal of Biomedical Science will not edit submitted manuscripts for style or language; reviewers may advise rejection of a manuscript if it is compromised by grammatical errors. Authors are advised to write clearly and simply, and to have their article checked by colleagues before submission. In-house copyediting will be minimal. Non-native speakers of English may choose to make use of a copyediting service.

Help and advice on scientific writing

The abstract is one of the most important parts of a manuscript. For guidance, please visit our page on "[Writing titles and abstracts for scientific articles](#)".

Tim Albert has produced for BioMed Central a [list of tips](#) for writing a scientific manuscript. [MedBioWorld](#) also provides a list of resources for science writing.

Abbreviations

Abbreviations should be used as sparingly as possible. They can be defined when first used or a list of abbreviations can be provided preceding the acknowledgements and references.

Typography

- Please use double line spacing.
- Type the text unjustified, without hyphenating words at line breaks.
- Use hard returns only to end headings and paragraphs, not to rearrange lines.
- Capitalize only the first word, and proper nouns, in the title.
- All pages should be numbered.
- Use the *Journal of Biomedical Science* reference format.
- Footnotes to text should not be used.
- Greek and other special characters may be included. If you are unable to reproduce a particular special character, please type out the name of the symbol in full.

Please ensure that all special characters used are embedded in the text, otherwise they will be lost during conversion to PDF.

Units

SI Units should be used throughout (liter and molar are permitted, however).

Last revised: 1 September 2009.