

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

**EFEITO DO PEPTÍDEO BETA-AMILÓIDE SOBRE A
BIOSSÍNTESE DE GANGLIOSÍDIOS E AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE NEUROPROTETORA DO GM1.**

FERNANDO KREUTZ

Porto Alegre, 2010

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

**EFEITO DO PEPTÍDEO BETA-AMILÓIDE SOBRE A
BIOSSÍNTESE DE GANGLIOSÍDIOS E AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE NEUROPROTETORA DO GM1.**

FERNANDO KREUTZ

**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.

Porto Alegre, 2010

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica;

Ao Departamento de Bioquímica Prof. Tuiskon Dick;

A Pró-Reitoria de Pesquisa;

Aos colegas e amigos dos laboratórios 21, 23 e 25 do Departamento de Bioquímica pelo apoio e amizade;

A minha orientadora e co-orientadora por todo o ensinamento e incentivo.

A FAPERGS pelo auxílio financeiro.

Ao CNPq pela bolsa concedida e pelo auxílio financeiro.

RESUMO

A doença de Alzheimer é uma desordem neurodegenerativa cuja patogenia não é completamente elucidada. Atribui-se ao peptídeo beta-amilóide (A β), em sua forma oligomérica ou fibrilada, um importante papel neste processo. Uma vez que a produção e a fibrilação do peptídeo ocorrem ao nível de membrana neural, sua dinâmica e composição lipídica podem modular a cascata amilóide e/ou interferir na extensão do dano gerado pela mesma. Tendo isto em vista e considerando o potencial sinalizatório dos glicosíngolipídios, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do peptídeo beta-amilóide (A β 25-35), em sua forma fibrilada ou não-fibrilada, sobre a biossíntese dos gangliosídios em modelo de cultura organotípica de hipocampo.

Para tanto, foram utilizados ratos Wistar de 6-8 dias, dos quais o hipocampo foi dissecado, fatiado e submetido à cultura. No 28º dia de cultura foi adicionado A β 25-35 (25 μ M), em sua forma fibrilada ou não fibrilada; após 24h adicionou-se ao meio D-[1-¹⁴C]-galactose para avaliar a biossíntese dos gangliosídios; no 30º dia a morte celular foi analisada com iodeto de propídio. A partir das fatias, os gangliosídios radiomarcados foram extraídos, purificados, analisados por HPTLC, fluorografia e densitometria.

Nossos resultados demonstraram uma alteração na biossíntese de gangliosídios induzida pelo peptídeo beta-amilóide A β 25-35, um efeito que foi dependente de seu estado de fibrilação. Desta maneira, o A β 25-35, em sua forma fibrilada, promoveu um aumento na biossíntese de GM3 e uma redução na biossíntese de GD1b, ao passo que o peptídeo não fibrilado levou a um aumento na síntese do gangliosídio GM1.

Uma vez que o GM3 é considerado um gangliosídio apoptótico, quando expresso em neurônios adultos, um aumento em sua síntese pode estar relacionado aos eventos tóxicos desencadeados pelo peptídeo beta-amilóide fibrilado. O GM1, por sua vez, ainda não possui um papel suficientemente claro no desenvolvimento da doença de Alzheimer. Uma série de efeitos neuroprotetores são atribuídos a este gangliosídio enquanto fortes evidências sugerem que o GM1 poderia acelerar o processo de fibrilação do beta-amilóide, e assim influenciar a progressão da doença.

A fim de investigar o papel do GM1 no presente modelo, realizamos uma série de experimentos com a finalidade de avaliar uma possível ação neuroprotetora deste gangliosídio. Como resultado, um pré-tratamento das fatias hipocâmpais com GM1(10 μ M) foi capaz de prevenir a toxicidade induzida pelo peptídeo beta-amilóide em sua forma fibrilada, como demonstram os resultados da captação de iodeto de propídio. Com o intuito de corroborar sua ação neuroprotetora, bem como investigar o mecanismo pelo qual esta neuroproteção seria mediada, analisamos o efeito de um tratamento com GM1 (1h, 6h, 12h ou 24h) sobre as alterações induzidas pelo peptídeo beta-amilóide no estado de fosforilação (ativação/inativação) da GSK3 β . Nossos resultados demonstraram um importante efeito neuroprotetor do GM1 após 24 horas de tratamento, uma vez que nestas circunstâncias este gangliosídio foi capaz de reverter a ativação (defosforilação) da GSK3 β , uma via de sinalização associada à morte celular programada.

Como conclusão, nossos resultados dão suporte a participação dos gangliosídios em modelos de doença de Alzheimer, e sugerem uma ação neuroprotetora do gangliosídio GM1 frente à toxicidade induzida pelo beta-amilóide, o que, no futuro, pode ser explorado como uma alternativa terapêutica ao tratamento do Alzheimer.

ABSTRACT

Alzheimer disease (AD) is a neurodegenerative disorder whose pathogenesis is still poorly understood. It is attributed to beta-amyloid peptide, in its fibrillar or non-fibrillar forms, an important role in the disease development and progression. Once the production and fibrillation of beta-amyloid peptide occurs on the neural membrane surface, the lipid dynamic and composition of these membranes could modulate amyloid cascade and/or interfere in the damage triggered by it.

Taking this into account, and considering the potential signalling role of glycosphingolipids, the objective of this study was to investigate the effect of fibrillar and non-fibrillar beta-amyloid peptide (A β 25-35) upon ganglioside biosynthesis in a model of organotypic hippocampal culture.

In order to do this, we used 6-8 days old Wistar rats, whose hippocampi were dissected, sliced and subjected to culture. On the 28th in vitro day, A β 25-35 (25 μ M) was added to the culture medium, in its fibrillar or non-fibrillar forms. After 24h incubation, D-[1-C¹⁴]-galactose was added to the medium with the purpose of labeling ganglioside; on day 30th in vitro day cell death was analyzed by PI uptake. The radiolabeled gangliosides were extracted from the hippocampal slices, purified, and analyzed by HPTLC, fluorography and densitometry.

Our results demonstrated an A β 25-35 induced alteration in ganglioside biosynthesis, an effect which seemed to be dependent on the peptide fibrillation state. Furthermore, the fibrillar A β 25-35 caused an increase in GM3 and a reduction in GD1b biosynthesis, whereas the non-fibrillar form of this peptide was able to enhance the synthesis of GM1 ganglioside.

Once GM3 is an apoptotic ganglioside, when expressed in adult neurons, an increase in its synthesis could take part of the toxic events triggered by the fibrillar beta-amyloid peptide. GM1, in turn, has a still poorly understood participation in Alzheimer development. A sort of neuroprotective effects are attributed to this ganglioside while several evidences suggest that GM1 could accelerate the endogenous fibril formation, and thence influence the disease progression.

To further investigate the role of GM1 ganglioside in our model, we have performed some experiments in order to test a possible neuroprotective effect of this gangliosides. As a result, a pre-treatment of the hippocampal slices with 10 μ M GM1 was able to prevent the toxicity triggered by the fibrillar beta-amyloid peptide, when measured by PI uptake protocol. In order to corroborate its neuroprotective action, as well as to investigate a candidate mechanism by which GM1 could promote neuroprotection, we have analyzed the effect of GM1 treatment (1h, 6h, 12h and 24h) upon the amyloid-induced alterations in GSK3 β phosphorylation/dephosphorylation state. Our results demonstrated an important effect of GM1 after 24h incubation, once it was able to reverse the amyloid-induced dephosphorylation (activation) of GSK3 β , a signalling pathway involved in apoptosis triggering.

Taken together, our results provides new and important support for the ganglioside participation in Alzheimer models, and suggests a protective role of GM1 upon the amyloid induced toxicity, which, in the future, could expand the therapeutic strategy available for Alzheimer disease treatment.

ABREVIATURAS

ApoE = Apolipoproteína E

APP = *Amyloid beta protein* = proteína beta-amilóide

A β /Abeta = *Amyloid beta peptide* = peptídeo beta-amilóide

A β 1-42 = Peptídeo beta-amilóide com 40 resíduos de aminoácidos

A β 25-35 = Peptídeo beta-amilóide semisintético composto da sequência 25-35 do peptídeo natural

BACE 1 = Principal enzima com atividade β -secretase

Cer-ase = ceraminidase

CNS= *Central Nervous System*= Sistema Nervoso Central

DA (AD) = Doença de Alzheimer (*Alzheimer's disease*)

FAD = *Familial Alzheimer's Disease* = Doença de Alzheimer do tipo familiar

Gal-ase = galactosidase

GalNAc = N-acetil galactosamina

GalNAcT = N-Acetil galactosamina transferase

GalT 1 = galactosil transferase 1

GalT 2 = galactosil transferase 2

GA β = *Ganglioside bounded beta-amyloid* = beta-amilóide ligado a gangliosídeo

Glc= glicose

Glc-ase = glicosidase

GSK3 β = *Glycogen synthase kinase 3 β* = enzima glicogênio sintase cinase 3 β

GSL = *Glycosphingolipids* = glicoesfingolipídios

HPTLC= *High Performance Thin Layer Chromatography*= Cromatografia em camada delgada de alta performance

LacCer = lactosilceramida

MAPK = microtubule associated proteins = Proteínas associadas a microtúbulo

PKA= *Protein Kinase A* = proteína quinase A

PKC = *Protein Kinase C* = proteína quinase C

PI (IP) = *Propidium iodide*= Iodeto de Propídio

PI3K = fosfatidil inositol 3 quinase

SA = *sialic acid* =ácido siálico

sAPP α = Fragmento solúvel da proteína precursora amilóide gerado por ação de α -secretase

sAPP β = Fragmento solúvel da proteína precursora amilóide gerado por ação de β -secretase

SialilT 1 = sialiltransferase 1

SialilT 2 = sialiltransferase 2

SialilT 3 = sialiltransferase 3

SialilT 4 = sialiltransferase 4

SialilT 5 = sialiltransferase 5

Trk = *Tirosine kinase receptor* = Receptor Tirosina cinase

β -gal = beta galactosidase

FIGURAS

Figura 1.1: Processamento amiloidogênico e não-amiloidogênico da APP por α -, β - e γ -secretases.....	03
Figura 1.2: Processo de oligomerização e fibrilação do peptídeo β -amilóide.....	05
Figura 1.3: Fosforilação da proteína Tau e formação dos emaranhados neurofibrilares.....	06
Figura 1.4: Estrutura dos principais gangliosídeos do SNC.....	09
Figura 1.5: Biossíntese das séries “o”, “a”, “b” e “c” dos gangliosídeos.....	11
Figura 1.6: Degradação dos gangliosídeos.....	13
Figura 1.7: Estrutura dos microdomínios de membrana (<i>Rafts</i>).....	15
Figura 1.8: Segregação das proteínas APP (Proteína Precursora Amilóide), β - secretase e α -secretase nos diferentes domínios de membrana.....	18
Figura 1.9: Mecanismo de fibrilação do β -amilóide a partir de sua interação com GM1 de membrana.....	19

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1 A DOENÇA DE ALZHEIMER.....	01
1.1.1 A Hipótese da Cascata Amilóide.....	02
1.1.1.1 <i>O Processamento da Proteína Precursora Amilóide (APP)</i>	02
1.1.1.2 <i>O Peptídeo β-amilóide</i>	04
1.1.2 A Hipótese da Degeneração do Citoesqueleto Neuronal.....	05
1.1.3 Interrelação das Hipóteses Patogênicas.....	06
1.2 GANGLIOSÍDIOS.....	08
1.2.1 Metabolismo dos Gangliosídios.....	10
1.2.2 A Localização Subcelular dos Gangliosídios.....	13
1.2.3 As Funções Biológicas Propostas aos Gangliosídios.....	14
1.2.4 Os <i>Rafts</i> e a Dinâmica das Membranas Neurais.....	15
1.3 A PARTICIPAÇÃO DOS GANGLIOSÍDIOS E DA DINÂMICA DAS MEMBRANAS NEURAI NA DOENÇA DE ALZHEIMER.....	16
2. OBJETIVOS.....	21
3. RESULTADOS.....	22
4. DISCUSSÃO.....	54
5. CONCLUSÕES.....	63
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64
7. ANEXO.....	77

1 INTRODUÇÃO

1.1 A DOENÇA DE ALZHEIMER

Descrita em 1906 por Alois Alzheimer, a doença de Alzheimer (DA) é uma desordem neurodegenerativa caracterizada por um comprometimento do sistema colinérgico, o que leva a um quadro clínico de perda progressiva da memória e das demais funções cognitivas (Suh and Checler, 2002).

Os danos neurológicos causados pela DA são ainda considerados irreversíveis. O prognóstico da doença costuma ser de 5 a 10 anos, período a partir do qual o paciente torna-se profundamente incapacitado, mudo e imóvel (Cotran et al., 1994).

Duas formas da doença são descritas. A forma da DA Familiar (FAD), que não perfaz mais do que 5% dos casos da doença, caracteriza-se por uma instalação mais precoce do quadro clínico, e seria devida a mutações em genes como o da proteína precursora amilóide (APP) ou das presenilinas I e II (Suh and Checler, 2002). A DA do tipo esporádico, por outro lado, representa em torno de 95% dos casos e apresenta uma evolução mais lenta, sendo que os sintomas raramente surgem antes de o paciente atingir a idade de 50 anos (Cotran et al., 1994; Suh and Checler, 2002).

Dentre os principais fatores de risco associados a DA, a idade é a que exerce maior influência. Além da idade, porém, a expressão do alelo $\epsilon 4$ do gene da apoE, o sexo feminino, injúria cerebral prévia e doenças cardiovasculares aumentariam os riscos de desenvolver-se a patologia (Suh and Checler, 2002).

Atualmente, a DA é considerada a principal forma de demência, atingindo mais de 15 milhões de indivíduos no mundo. Sua incidência aumenta em função da idade. Estatísticas indicam que a doença atingiria 1% da população na faixa etária de 60-64 anos e mais de 40% da população com idade acima de 85 anos (Zinser et al., 2007). Considerando projeções do crescimento populacional que indicam que o número de indivíduos com mais de 80 anos atingirá a casa dos 300 milhões em 2050, isso significa que em menos de 50 anos o número de pacientes com DA passará dos 100 milhões (Suh and Checler, 2002). Em vista do constante cuidado que os pacientes com DA requerem, estes dados tornam-se demasiado alarmantes, fazendo com que cresça o interesse em melhor compreender os mecanismos envolvidos na patogenia da doença, bem como desenvolver alternativas terapêuticas mais racionais e efetivas.

A DA é uma enfermidade extremamente complexa cujos mecanismos patogênicos ainda não foram suficientemente elucidados (Suh and Checler, 2002). Os dois principais achados morfológicos relacionados à DA, quais sejam, a formação de placas senis extracelulares, e a formação de emaranhados neurofibrilares intracelulares, conduziram à elaboração das duas principais hipóteses que tentam explicar a sua patogenia: a hipótese da cascata β -amilóide e a hipótese da degeneração do citoesqueleto neuronal, respectivamente (Suh and Checler, 2002; Zinser et al., 2007).

1.1.1 A Hipótese da Cascata Amilóide

A identificação de placas ou agregados peptídicos extracelulares, por meio de análise histológica *post mortem* de cérebros de indivíduos com a DA, levantou a hipótese de que este evento poderia estar relacionado com o desenvolvimento da enfermidade, repercutindo nos danos neurais inerentes a esta neuropatia. A identificação do peptídeo β -amilóide como principal componente destas placas senis, aumentou o interesse em desvendar ou compreender o mecanismo pelo qual este peptídeo é formado, bem como o processo que leva a sua agregação na forma de placa e, finalmente, elucidar a forma pela qual este β -amilóide poderia levar ao dano neural observado (Graeber et al., 1998; Golde, 2006).

1.1.1.1 O Processamento da Proteína Precursora Amilóide (APP)

A proteína precursora amilóide (APP) é uma glicoproteína presente nas membranas neurais. Expressa de forma constitutiva, sua função fisiológica ainda não foi completamente elucidada, contudo seu processamento, por meio de ação de enzimas proteolíticas, pode levar a liberação do peptídeo β -amilóide, que corresponde a seu domínio transmembrana (Suh and Checler, 2002; Zinser et al., 2007).

Sendo basicamente alvo de três tipos de enzimas proteolíticas, a saber, α -, β - e γ -secretases, a proteína precursora amilóide pode seguir duas vias de processamento: o processamento amiloidogênico, que conduz a liberação de um peptídeo β -amilóide; ou o processamento dito não-amiloidogênico, que cliva a APP de forma diferencial, prevenindo a formação do β -amilóide (Suh and Checler, 2002; Zinser et al., 2007).

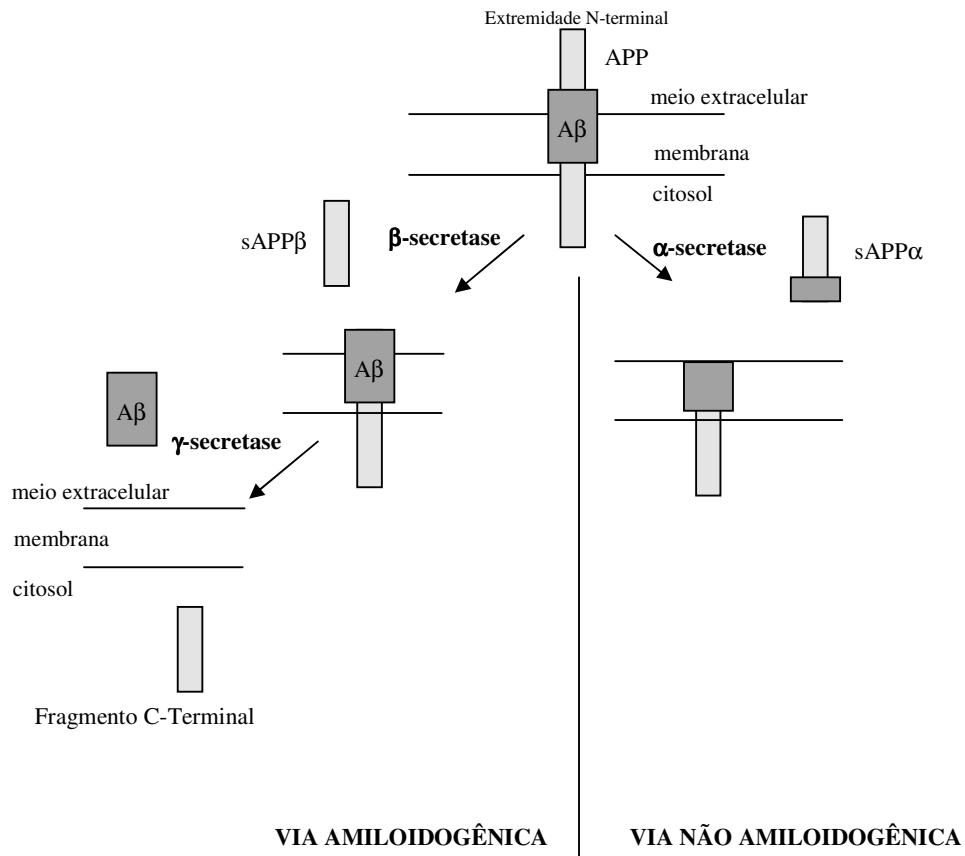


Figura 1.1: Processamento amiloidogênico e não-amiloidogênico da APP por α -, β - e γ -secretases. Representação esquemática da APP e de seus fragmentos proteolíticos sAPP α , sAPP β e A β . (Adaptado de Suh and Checler, 2002)

O processamento amiloidogênico inicia-se quando a proteína precursora amilóide torna-se alvo de enzimas com atividade β -secretase (Figura 1.1). As β -secretases são aspartil proteases transmembranas, cuja principal representante é a enzima BACE-I, que clivam a APP no segmento N-terminal de seu domínio β -amilóide, liberando o fragmento solúvel sAPP β ao meio extracelular. O fragmento que permanece ligado à membrana será, então, alvo de um complexo enzimático com atividade γ -secretase, o qual promoverá uma clivagem intramembrana no segmento C-terminal do domínio β -amilóide, liberando um peptídeo β -amilóide ao meio extracelular (Suh and Checler, 2002; Zinser et al., 2007).

Já o processamento não-amiloidogênico inicia-se quando a APP torna-se alvo de enzimas com atividade α -secretase (Figura 1.1). As α -secretases são metaloproteases de membrana que, ao contrário das β -secretases, clivam a APP dentro do domínio amilóide, prevenindo a formação do peptídeo β -amilóide, e ao contrário disso, liberando ao meio extracelular o fragmento solúvel sAPP α , considerado neuroprotetor (Suh and Checler, 2002; Zinser et al., 2007).

1.1.1.2 O Peptídeo β -amilóide

O β -amilóide produzido pode ter basicamente dois destinos: permanecer em forma solúvel no meio extracelular ou agregar-se, tornando-se insolúvel e depositando-se na forma de placas senis. Por muito tempo a forma agregada e insolúvel do β -amilóide era considerada a única forma patogênica deste peptídeo, entretanto estudos recentes indicam que formas oligoméricas do β -amilóide, as quais corresponderiam a formas solúveis do mesmo, poderiam apresentar grande potencial neurotóxico e afetar de forma significativa diferentes vias de sinalização celular. Estes arranjos distintos do peptídeo podem representar formas intermediárias do processo de fibrilação, ou corresponder a uma via distinta de processamento e polimerização do peptídeo β -amilóide (Figura 1.2). Desta maneira, ainda não há um consenso sobre qual forma apresentaria maior participação sobre o desenvolvimento e a evolução da DA: a fibrilada ou os diferentes arranjos que caracterizam o peptídeo em sua forma solúvel (Suh and Checler, 2002; Haass and Selkoe, 2007; Pimplikar, 2009).

Desta forma, a cascata amilóide não pode ser resumida à formação de placas senis, mas deve ser compreendida como um processo dinâmico e complexo em que não apenas a forma fibrilada, mas também formas intermediárias ou alternativas de polimerização do peptídeo exerceriam papel crucial nas alterações neurais observadas na DA. Assim, a idéia inicial de que seria possível bloquear os efeitos neurotóxicos desencadeados pela cascata amilóide, ao impedir-se o processo de fibrilação e de formação das placas senis, passa a ser questionada. Isto devido a estudos recentes que propõem que um bloqueio do processo de fibrilação poderia resultar em maior formação de oligômeros de β -amilóide, os quais embora sejam solúveis e não evoluam para a formação de placas, apresentariam efeitos deletérios em potencial (Suh and Checler, 2002; Haass and Selkoe, 2007; Pimplikar, 2009).

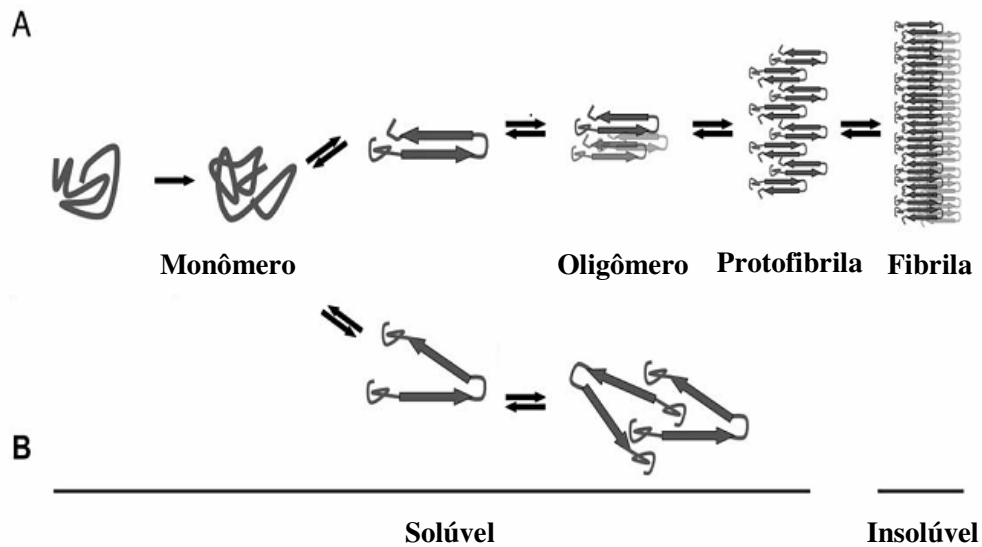


Figura 1.2: Processo de oligomerização e fibrilação do peptídeo β -amilóide: (A) O peptídeo β -amilóide pode sofrer um processo sequencial de agregação, formando oligômeros, protofibrilas e fibrilas insolúveis. (B) Alternativamente, o β -amilóide pode sofrer um processo de oligomerização independente, formando oligômeros que, embora não evoluam para formação de fibrilas, apresentariam considerável efeito neurotóxico. (Adaptado de Da Silva et al., 2009)

1.1.2 A Hipótese da Degeração do Citoesqueleto Neuronal

A observação de emaranhados neurofibrilares intracelulares e a identificação da proteína Tau, uma proteína da família das MAP's (*microtubule associated proteins*), como unidade formadora destes emaranhados, deram suporte à hipótese de que uma degeneração do citoesqueleto neuronal pudesse estar envolvida na patogenia da DA (Golde, 2006).

A proteína Tau é uma proteína cuja principal função bioquímica é a estabilização dos microtúbulos, estando envolvida na regulação da polimerização e despolimerização dos mesmos durante o processo de extensão axonal. Atua ligando-se às unidades de tubulina, possibilitando, desta forma, a organização em hélice das mesmas e o crescimento/alongamento dos microtúbulos. Sua atividade é regulada, a nível pós-traducional, por mecanismos de fosforilação e desfosforilação (Drechsel et al.,

1992). Quando sob ação de enzimas cinases diversas, tais como GSK-3 β , a proteína Tau pode ser hiperfosforilada, processo que compromete a ligação desta proteína à tubulina e, conseqüentemente, leva a uma desestabilização/desestruturação dos microtúbulos bem como à fibrilação e deposição intracelular da proteína Tau na forma de emaranhados neurofibrilares (Figura 1.3) (Suh and Checler, 2002; Iqbal et al., 2005; Hernandez and Avila, 2007).

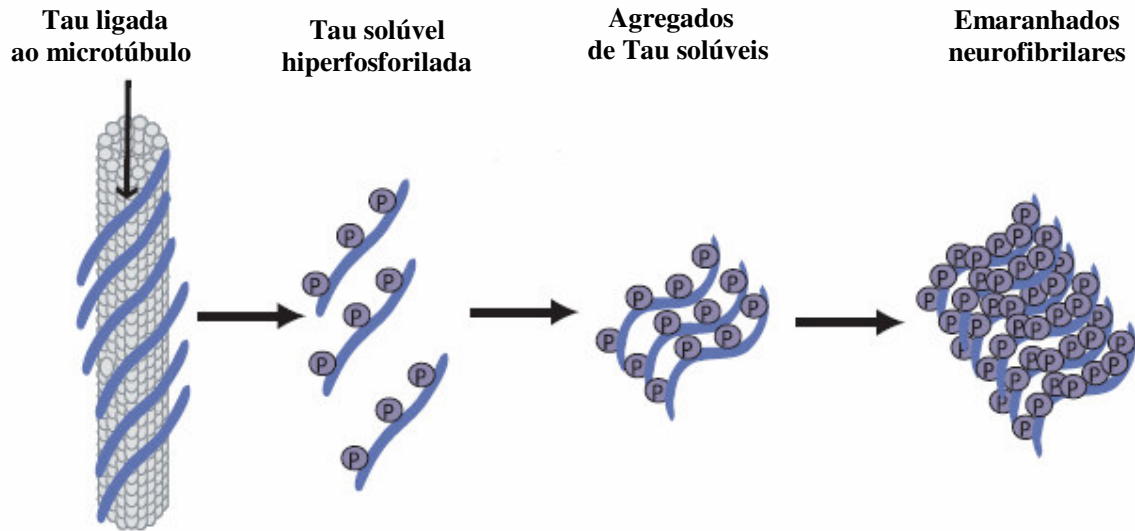


Figura 1.3: Fosforilação da proteína Tau e formação dos emaranhados neurofibrilares.

(Adaptada de Golde, 2006)

O desmonte dos microtúbulos, com a conseqüente desorganização do transporte axonal, aliado a deposição intracelular de proteína Tau hiperfosforilada, acarretam em alterações bioquímicas e morfológicas dos neurônios, culminando em última análise, em processo de perda de função e morte neuronal (Suh and Checler, 2002; Iqbal et al., 2005; Hernandez e Avila, 2007).

1.1.3 Interrelação das Hipóteses Patogênicas

Nenhuma destas hipóteses, quando consideradas isoladamente, representaria fielmente o verdadeiro mecanismo que desencadeia a patologia. Condizente à complexidade que representa a DA, o mais racional talvez fosse aceitar que os

diferentes mecanismos patogênicos sugeridos estejam intimamente correlacionados, de forma que o desencadeamento de um interferisse no desencadear de outro.

O fato de a maioria das mutações que levam à forma familiar DA situar-se nos genes da APP (aumentando os níveis de A β 1-42) ou das presenilinas (enzimas com atividade γ -secretase) reforça a idéia de que o processamento amiloidogênico da APP, com liberação de β -amilóide, seria uma etapa chave ao desenvolvimento da DA. Contudo, os defensores da hipótese da proteína Tau, sustentam-se no fato de que a formação dos emaranhados neurofibrilares, e não a de placas senis, correlacionar-se-iam com os níveis de déficit cognitivo dos pacientes (Suh and Checler, 2002).

Algumas pesquisas têm demonstrado que a liberação do β -amilóide e a formação de placas senis favoreceriam a fosforilação da proteína Tau e, conseqüentemente, corroboraria em uma maior formação dos emaranhados neurofibrilares. De fato, estes estudos demonstram que o A β 1-42, uma vez injetado em cérebro de camundongos mutantes para a proteína Tau, leva a um aumento de até cinco vezes no número de emaranhados neurofibrilares na região injetada. Na verdade, apesar de alguns pesquisadores sustentarem a idéia de que a formação de placa *per se* não seria suficiente para desencadear a formação dos emaranhados, há suficientes indícios de que a deposição do β -amilóide pelo menos acelere tal processo (Suh and Checler, 2002).

O mecanismo pelo qual ocorreria a conexão entre a formação de placa amilóide e de emaranhados neurofibrilares ainda não foi completamente compreendido, porém é sugerida a participação dos seguintes eventos:

a) ativação de proteínas cinases por parte do β -amilóide, em especial a GSK3 β , principal enzima envolvida na fosforilação da proteína Tau (Suh and Checler, 2002; Rapoport and Ferreira, 2000; Nassif et al., 2007);

b) liberação de citocinas, decorrentes do processo de gliose reativa desencadeado pelo peptídeo fibrilado, as quais poderiam modular o processo de fosforilação da proteína Tau (Blurton-Jones and Laferla, 2006; Montagut et al., 2006);

c) inibição da atividade proteossômica por parte do β -amilóide, o que favoreceria a formação e depósito dos emaranhados neurofibrilares (Blurton-Jones and Laferla, 2006; Montagut et al., 2006).

De qualquer forma, mesmo que o mecanismo exato não seja por um todo compreendido, a constatação de que mutações no gene da APP e das presenilinas levam

tanto à formação de placas como de emaranhados neurofibrilares, sustenta a hipótese de que o evento β -amilóide antecederia a “*Tauopatia*” (Suh and Checler, 2002).

Estes achados viriam a reforçar as evidências que propõem o β -amilóide como sendo um agente causal da doença de Alzheimer, e em parte dariam sustentação ao emprego de modelos experimentais de toxicidade do peptídeo β -amilóide para o estudo de alterações bioquímicas/comportamentais que acompanhariam a DA, bem como para estudos farmacológicos para esta patologia (Suh and Checler, 2002).

Assim, torna-se um grande desafio elucidar o processo pelo qual a cascata amilóide, compreendendo produção das formas solúvel e/ou fibrilada do β -amilóide, desencadearia seus efeitos tóxicos, bem como as alterações bioquímicas e celulares que antecederiam a perda de função ou a morte neuronal. Diferentes estudos atribuem parte dos efeitos tóxicos do β -amilóide a alterações que o mesmo promoveria na homeostasia do cálcio (Mattson and Chan, 2001; Suh and Checler, 2002), no desencadear de estresse oxidativo e processo inflamatório (Markesbery, 1997; Monji et al., 2001; Suh and Checler, 2002), e na ativação de vias sinalizatórias envolvidas no desencadear de morte celular, como é o caso da via da GSK3 β (Suh and Checler, 2002; Nassif et al 2007; Hooper et al., 2008; Hernández, et al., 2009a,b).

Apesar disso, é pouco oportuno e sensato centralizar ou resumir o efeito da cascata amilóide sobre um único parâmetro, visto que muitas alterações poderiam anteceder ou mesmo mediar a ativação dos eventos celulares acima citados. Desta forma, diversos pesquisadores têm dirigido seus esforços à identificação das mais diversas alterações bioquímicas e celulares que poderiam ter participação sobre a cascata amilóide, e desta forma acompanhar ou promover o desenvolvimento da DA.

Neste sentido, um número considerável de trabalhos indica a participação de lipídios de membrana, ou da organização e dinâmica das mesmas, no processamento da cascata amilóide, bem como apontam o potencial destes lipídios em modular parte dos efeitos biológicos desencadeados pelo próprio peptídeo β -amilóide (Ariga et al., 2008).

1.2. GANGLIOSÍDIOS

Gangliosídios correspondem a glicoesfingolipídios (GSL) de membrana, que normalmente apresentam em sua estrutura pelo menos um resíduo de ácido siálico. O ácido siálico, considerado componente característico da família dos gangliosídios, pode ser representado pelo ácido N-acetil-neuramínico ou ácido N-glicolil-neuramínico,

sendo o primeiro o que mais comumente compõe os gangliosídeos cerebrais. A quantidade de resíduos de ácido siálico por molécula de gangliosídeo varia de 1 a 7, embora existam gangliosídeos desprovidos de ácido siálico, os quais são denominados assialogangliosídeos. Os resíduos de ácido siálico ligam-se às unidades de galactose da cadeia oligossacarídica via ligação glicosídica α 2-3, ou a outros resíduos de ácido siálico via ligação α 2-8 (Figura 1.4) (Yu and Saito, 1992).

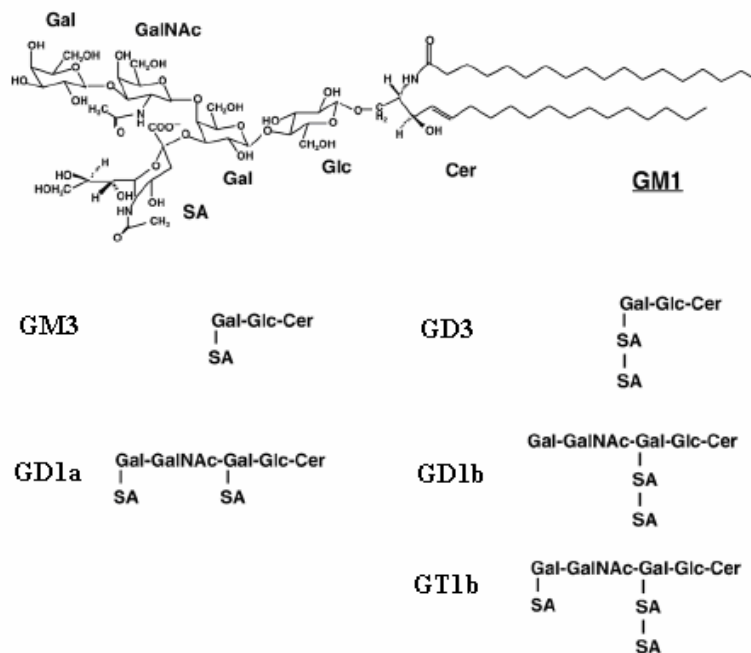


Figura 1.4: Estrutura dos principais gangliosídeos do SNC (GM3, GD3, GM1, GD1a, GD1b e GT1b): CER=ceramida; Gal=galactose; GalNAc=N-acetil-galactosamina; Glc=glicose; SA=sialic acid (ácido siálico) (Adaptado de Matsuzaki, 2007)

A variação na extensão da cadeia oligossacarídica, bem como no número e na disposição dos resíduos de ácido siálico, conferem aos gangliosídeos certa heterogeneidade. Os mesmos podem ser classificados, segundo sua rota de síntese, em quatro séries: o, a, b, c.

A nomenclatura mais utilizada para designar as diferentes espécies de gangliosídeos foi proposta por Svennerholm (1963). Segundo o sistema proposto, os gangliosídeos recebem uma nomenclatura conforme sua estrutura química. Eles são denominados pela letra G, seguida de letra maiúscula (M, D, T, Q, P, H ou S) que

designa o número de resíduos de ácido siálico na molécula (monossialo-, dissialo-, trissialo-, tetrassialo-, pentassialo, hexassialo- ou heptassialo-, respectivamente), seguido de um número que, por convenção, é a subtração da quantidade de resíduos de açúcares neutros presentes na molécula, do número 5, e finalmente seguido de uma letra minúscula (a, b ou c) que distingue as diferentes espécies do mesmo grupo mono, di, tri e tetrassialilado. Assim, o monossialotetra-hexosilgangliosídeo GM1 (GM1a), que é considerado o protótipo da família gânglio (família de GSL a que pertencem os gangliosídios), pertence à série “a” da rota de síntese dos gangliosídios, sendo constituído por um resíduo de ácido siálico (unido à galactose interna por ligação glicosídica α 2-3) e quatro resíduos de oses neutras unidas entre si através de ligações glicosídicas β (Mocchetti, 2005).

1.2.1 Metabolismo dos Gangliosídios

A biossíntese dos gangliosídios é um processo extremamente complexo que ocorre no retículo endoplasmático e no aparelho de Golgi (d'Azzo et al., 2006).

No retículo endoplasmático ocorre a síntese do núcleo esfingóide e a montagem da molécula de ceramida. Sob ação da enzima serina palmitoil-CoA-transferase, serina e palmitoil-CoA são convertidos em 3-deidroesfinganina que, por reações subseqüentes, dão origem a esfinganina, esfingosina ou fitoesfingosina. O núcleo esfingóide formado é então unido a uma cadeia de ácido graxo por meio de ligação amida, dando origem a uma molécula de ceramida (Mocchetti, 2005; Zinser et al., 2007).

A ceramida é então transportada ao aparelho de Golgi, onde é glicosilada ao cerebrosídeo glicosilceramida, por meio de uma reação catalisada pela enzima glicosilceramida sintase. Este cerebrosídeo torna-se substrato da galactosiltransferase I, sendo convertido a lactosilceramida (LacCer). A lactosilceramida, por sua vez, é sialilada em seu resíduo de galactose por ação da enzima GM3 sintase (Sialiltransferase I), dando origem ao primeiro gangliosídeo: GM3. Seguindo a via de síntese dos gangliosídios, o GM3 pode ser novamente sialilado por ação da enzima GD3 sintase (sialiltransferase II), recebendo o segundo resíduo de ácido siálico a ser unido por ligação α 2-8 ao ácido siálico já presente na molécula, e assim dar origem ao gangliosídeo GD3 (Figura 1.5) (d'Azzo et al., 2006).

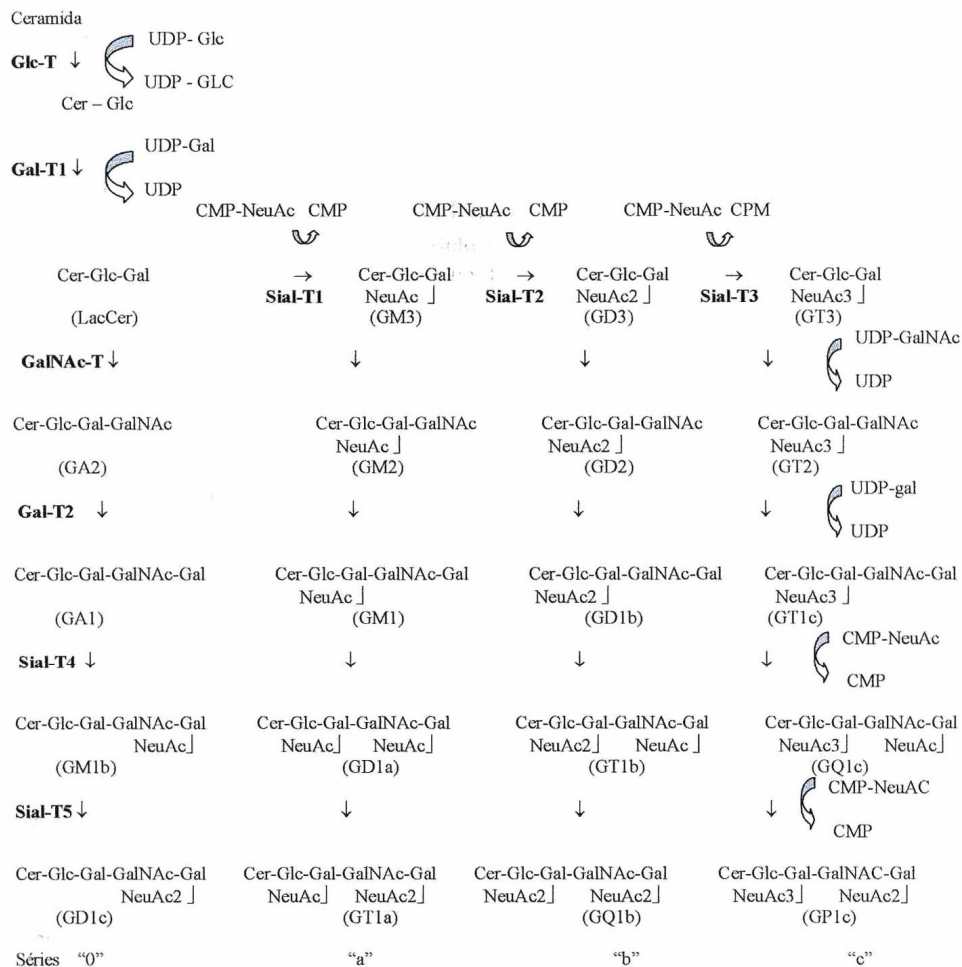


Figura 1.5: Biossíntese das séries "o", "a", "b" e "c" dos gangliosídios.

(Adaptado de Maccioni et al., 1999)

Durante o período embrionário, GM3 e GD3 são os gangliosídios predominantes. À medida que o SNC amadurece, ocorre a maturação das enzimas envolvidas na biossíntese de gangliosídios mais complexos. Desta forma, N-acetilgalactosamina transferase (GalNAc-T) transfere um resíduo de N-acetilgalactosamina aos substratos GM3 e GD3, dando origem respectivamente aos gangliosídios GM2 e GD2. A atividade relativa das enzimas GD3 sintase e GalNAc-T determina o direcionamento do processo biossintético para as duas séries de gangliosídios de maior expressão no SNC adulto: séries a e b, respectivamente. Reações subsequentes de galactosilação e sialilação (Figura 1.5) darão origem aos gangliosídios complexos de

maior expressão no tecido neural, respectivamente: GM1 e GD1a (série a); GD1b e GT1b (série b) (Maccioni et al., 2002; Sohn et al., 2006).

A regulação da biossíntese dos gangliosídeos ainda é tema de pesquisa, não tendo sido completamente elucidada. A nível gênico, a expressão da enzima GM3 sintase responde a ação de ésteres de forbol ou, indiretamente, a ação de proteína cinase A e C (PKA e PKC), proteína cinase ativada por estresse/cJNK e p38 MAPK, por meio do sítio CREB presente em sua região promotora. A sublocalização da enzima no aparelho de Golgi, bem como a presença de isoformas da GM3 sintase, também afetam o processo biossintético. Duas isoformas de GM3 sintase são descritas em células de mamíferos, uma isoforma menor e localizada no Golgi proximal (cis/medial/trans) primariamente envolvida na síntese dos gangliosídeos mais simples (GM3 e GD3); e uma isoforma maior, localizada no Golgi distal, a qual está envolvida na produção de GM3 que será direcionado para a biossíntese de gangliosídeos complexos (GM1, GD1a, GD1b, GT1b). Outro fator importante à regulação da biossíntese dos gangliosídeos é o fato de as enzimas envolvidas no processo formarem complexos multienzimáticos que direcionam a formação de produtos (gangliosídeos) específicos, segundo a atividade relativa das enzimas do complexo enzimático, bem como da sublocalização do mesmo no aparelho de Golgi (Prokazova et al., 2009).

O catabolismo dos gangliosídeos também é um evento importante na homeostasia destes GSL, podendo ocorrer na superfície da membrana plasmática ou ocorrer no ambiente lisossomal, após evento endocítico (Maccioni et al., 2002; d'Azzo et al., 2006).

Na superfície celular, ou na superfície de vesículas endocíticas, isoformas de neuroaminidases residentes de membrana, tais qual neuroaminidase 3 (Neu3), catalizam a conversão de multissialogangliosídeos em gangliosídeos menos complexos por meio de clivagem da ligação α 2-3 entre ácido siálico e galactose terminal/distal da cadeia oligossacarídica, e das ligações α 2-8 entre dois resíduos de ácido siálico unidos entre si (Achyuthan and Achyuthan, 2001; Zanchettim et al., 2007; Miyagi et al., 2008a,b).

A nível lisossomal ocorre o processo de degradação dos gangliosídeos, onde a ação combinada e subsequente de neuroaminidases (sialidases), beta-galactosidase, hexoaminidases e beta-glicosidase levam a degradação dos gangliosídeos a ceramida. (Figura 1.6) (d'Azzo et al., 2006).

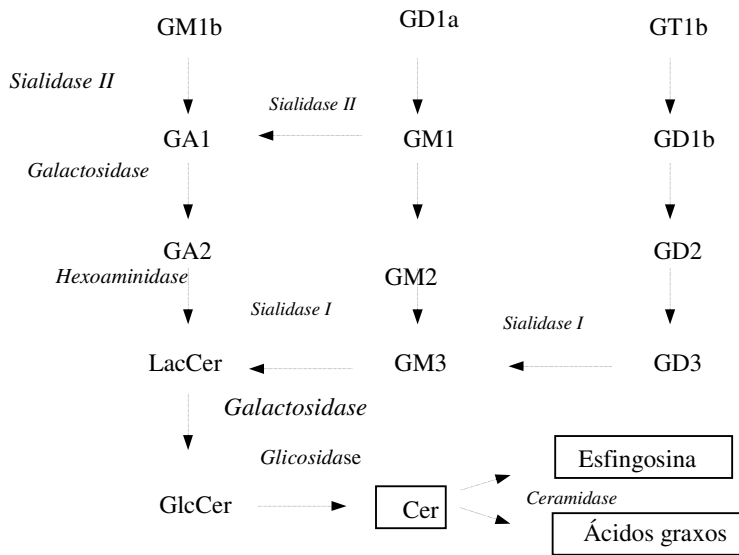


Figura 1.6: Degradação dos gangliosídeos. (Adaptado de d’Azzo et al., 2006)

É a regulação conjunta dos processos de síntese, reciclagem e degradação que permite à célula modular seu conteúdo e perfil de gangliosídeos segundo seu estágio de desenvolvimento/ontogenia, o momento celular e o ambiente no qual a mesma está inserida. O perfil de gangliosídeos é, portanto, não apenas tecido- e célula-específico, mas apto a ser modulado segundo as necessidades celulares. (Maccioni et al., 2002; Prokazova et al., 2009).

1.2.2 A Localização Subcelular dos Gangliosídeos

Correspondendo a família de glicoesfingolipídios com maior expressão no sistema nervoso central, os gangliosídeos são encontrados em praticamente todas as membranas celulares de mamíferos, estando presentes, contudo, em maior abundância nas membranas neurais, onde perfazem mais de 10% do conteúdo lipídico total. Expressos majoritariamente na fatia exofacial das membranas neurais, apresentam-se inseridos no meio hidrofóbico das mesmas através de seu núcleo ceramida, projetando sua cadeia glicídica hidrofílica para o ambiente extracelular (Mocchetti, 2005).

Há, no entanto, trabalhos que demonstram a presença de gangliosídeos não apenas na membrana plasmática, mas também nas membranas que compõem as demais

organelas celulares, bem como na membrana que reveste o núcleo da célula (Ledeen and Wu, 2006a,b; Garofalo et al., 2007; Tempera et al., 2008).

1.2.3 As Funções Biológicas Propostas aos Gangliosídeos

Aos gangliosídeos têm sido atribuídas as mais diversas funções biológicas, podendo atuar em processos de ontogenia celular e tecidual, bem como modular diversos processos bioquímicos e fisiológicos.

De grande importância nos processos de proliferação e diferenciação celular, os gangliosídeos são capazes de modular o ciclo celular, afetar a expressão gênica e a capacidade responsiva da célula frente a fatores tróficos. No sistema nervoso central, gangliosídeos participam da interação neurônio-glia, influenciando a migração neural, a formação bem como a manutenção das sinapses. Uma vez apresentando a capacidade de interagir com diversos componentes extracelulares a partir de sua cadeia oligossacarídica, os gangliosídeos parecem facilitar a deposição de mielina, o que lhes confere um papel importante no processo de mielinização (Mendez-Otero and Santiago, 2001; Vyas and Schnaar, 2001; Negreiros et al., 2003; Freire et al., 2004; Mocchetti et al., 2005; Ichikawa et al., 2009; Lopez and Schnaar, 2009).

Aos gangliosídeos é também atribuída uma participação nos mecanismos de transmissão sináptica, neuroplasticidade e formação de memória. Capazes de interagir com alguns neurotransmissores através de interações eletrostáticas, os gangliosídeos presentes nas membranas pós-sinápticas concentrariam tais neurotransmissores e os direcionariam a seus respectivos receptores protéicos. Além disso, complexas interações formadas entre gangliosídeos, colesterol e os receptores protéicos possibilitariam uma modulação da conformação e da atividade dos mesmos, afetando a resposta celular a ser desencadeada pelo processo sináptico (Svennerholm, 1980; Rahmann, 1995; Jia-Qi et al., 2005; Mocchetti et al., 2005; Fantini and Barrantes, 2009).

Como já comentado, porém, os gangliosídeos formam uma família muito heterogênea, de forma que diferentes gangliosídeos poderiam estar envolvidos em diferentes funções fisiológicas/bioquímicas, dependendo do momento e das circunstâncias celulares em que são expressos, bem como de sua localização e da forma como se organizam e se dispõem nas membranas celulares.

Neste sentido, ao GM1, um dos gangliosídeos mais abundantes no SNC adulto, seria atribuído um efeito neuroprotetor e neurotrófico (Mocchetti, 2005), ao passo que

os gangliosídios GM3 e GD3, de maior expressão na fase embrionária, estariam envolvidos com o desencadear de processos apoptóticos quando expressos em células neuronais maduras (Kristal and Brown, 1999; Garcia-Ruiz et al., 2000; Sohn et al., 2006; Valaperta et al., 2006).

Uma das principais participações dos gangliosídios, no entanto, é enquanto componente lipídico funcional dos microdomínios de membrana denominados *rafts* lipídicos.

1.2.4 Os *Rafts* e a Dinâmica das Membranas Neurais

Os *rafts* correspondem a microdomínios de membrana enriquecidos em colesterol e glicosfingolipídios (Figura 1.7). Formados em decorrência de uma interação preferencial entre o núcleo hidrofóbico do colesterol e as bases esfingóides que compõem os glicosfingolipídios, os *rafts* seriam formados a partir do Golgi ou na superfície da membrana plasmática, como decorrência da difusão lateral de seus lipídios (Simons and Ikoren, 1997; Chauhan, 2003).

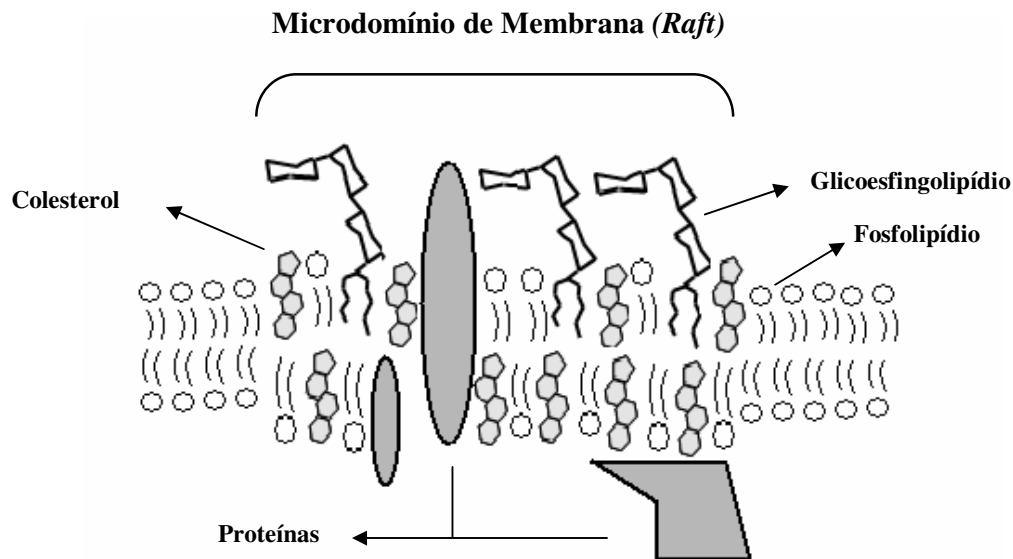


Figura 1.7: Estrutura dos microdomínios de membrana (*Rafts*): Enriquecidos em colesterol e em glicosfingolipídios, os microdomínios segregam proteínas de membrana e compartimentalizam eventos celulares

(Adaptado de Alchorn, 2007)

Correspondendo a estruturas extremamente dinâmicas, os *rafts* podem ser formados ou desmontados rapidamente, ou ter sua composição lipídica e protéica alterada conforme o momento e as necessidades celulares. Diferentes *rafts* podem coalescer, num processo denominado *clustering*, e desta maneira formar plataformas lipídicas maiores, que permitam a aproximação e interação momentânea de proteínas anteriormente segregadas em microdomínios distintos. Este processo tem despertado muito interesse, pois permitiria à célula manter enzimas ou receptores protéicos em estado de *off state*, até o momento em que, sendo sinalizada, a célula promova, por um mecanismo ainda não completamente elucidado, o encontro dirigido de microdomínios e a ativação de uma resposta ou de uma via de sinalizatória específica (Simons and Ehehalt, 2002; Chauhan, 2003; Reid et al., 2007).

Por outro lado, como a funcionalidade de uma proteína é influenciada pela conformação espacial de suas cadeias polipeptídicas, o ambiente lipídico no qual esteja inserida pode ser um fator importante à modulação de sua atividade. Assim, determinadas proteínas apresentam-se ativas unicamente quando inseridas nos *rafts*, ao passo que outras apresentam atividade mesmo quando fora destes microdomínios (Simons and Ehehalt, 2002; Wahrle et al., 2002; Cheng et al., 2007).

A composição lipídica dos microdomínios de membrana dita sua formação e dinâmica. Ao passo que o colesterol é considerado o principal constituinte lipídico responsável pela estruturação e estabilização dos *rafts*, os gangliosídios seriam responsáveis pela funcionalidade destes microdomínios. Ao interagir com proteínas de membrana através de suas cadeias oligossacarídicas ou de seu núcleo esfingóide, os gangliosídios podem afetar a segregação destas proteínas nos *rafts* e diretamente determinar alterações na conformação e funcionalidade das mesmas, como anteriormente comentado (Chauhan, 2003; Fantini and Barrantes, 2009).

1.3 A PARTICIPAÇÃO DOS GANGLIOSÍDIOS E DA DINÂMICA DAS MEMBRANAS NEURAIIS NA DOENÇA DE ALZHEIMER

Em virtude das diversas funções biológicas atribuídas aos gangliosídios e à organização/dinâmica lipídica das membranas, alterações na expressão destes lipídios, bem como de sua organização nas membranas biológicas, podem acompanhar ou participar do desenvolvimento das mais diversas patologias, desde erros inatos do metabolismo (Trindade et al., 2002; Stefanello, et al., 2007; Vianna et al., 2008),

processos isquêmicos (Trindade et al., 2001; Ramirez et al., 2003), ou mesmo doenças neurodegenerativas como a DA (Simons e Ehehalt, 2002; Cheng et al., 2007; Ariga et al., 2008).

Neste sentido, um crescente número de pesquisas têm sido realizadas com o intuito de esclarecer a real participação dos gangliosídeos e dos *rafts* lipídicos no desencadear dos eventos que levam ao desenvolvimento da DA, bem como de sua participação nos danos neurais associados a esta patologia.

Foi demonstrado que a amiloidogênese é um processo que ocorre nos *rafts* de membrana. Uma vez que a principal enzima com atividade β -secretase (BACE1) tem sua maior atividade em um ambiente rico em colesterol e glicoesfingolipídios (*raft*), sua localização nestes microdomínios é fundamental para a sua funcionalidade. Por outro lado, a Proteína Precursora Amilóide (APP) pode ser encontrada tanto nos *rafts* lipídicos como fora destes microdomínios (domínio fosfolipídico), sendo sua segregação nestes distintos domínios de membrana um evento regulável pela célula e que determinaria seu processamento: amiloidogênico ou não-amiloidogênico (Figura 1.8). Desta forma, o pool de APP presente nos *rafts* encontraria um ambiente favorável à clivagem efetuada por BACE1, e conseqüentemente seria alvo de processamento amiloidogênico, levando a formação de um peptídeo β -amilóide. Por outro lado, a APP presente no domínio fosfolipídico, por estar menos propensa a interagir com BACE1, seria alvo preferencial de enzimas α -secretases, que dirigem seu processamento para a não formação do peptídeo β -amilóide (processamento não-amiloidogênico) (Chauhan, 2003; Ehehalt et al., 2003; Reid et al., 2007; Zinser et al., 2007).

Embora não esteja claro quais eventos determinam a segregação de APP nos distintos domínios de membrana, o fato de ser demonstrada uma interação entre esta proteína e o gangliosídeo GM1 (um gangliosídeo que acumula nos *rafts* em função da idade) (Yamamoto et al., 2008; Zhang et al., 2009), leva-nos a supor que a composição lipídica dos microdomínios de membrana possa influenciar a localização da APP nos *rafts*, e, conseqüentemente, a produção do peptídeo β -amilóide (Zha et al., 2004). Condizente a isto, foi demonstrado que um tratamento de culturas celulares com um inibidor da biossíntese de gangliosídeos seria capaz de reduzir a amiloidogênese, efeito revertido pelo tratamento com GSL exógenos (Tamboli et al., 2005).

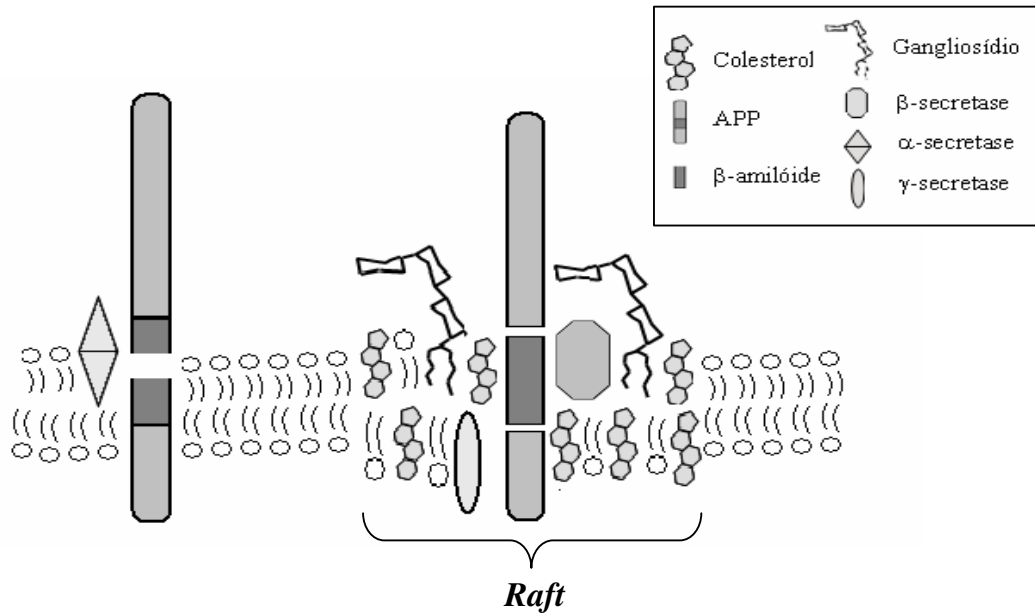


Figura 1.8: Segregação das proteínas APP (Proteína Precursora Amilóide), β -secretase e α -secretase nos diferentes domínios de membrana. A APP inserida nos *rafts* interage com a cadeia oligossacarídica dos gangliosídeos e é alvo de β - e γ -secretases, sofrendo processamento amiloidogênico. A APP não inserida nos *rafts* torna-se alvo preferencial de α -secretases, e segue via não-amiloidogênica de processamento.

O processo de fibrilação do peptídeo β -amilóide também é um evento que ocorreria ao nível dos *rafts* de membrana. Neste sentido, é demonstrado que a interação entre o peptídeo β -amilóide e o resíduo de ácido siálico do gangliosídeo GM1, conduziria a alterações conformacionais na estrutura do peptídeo, no sentido de estabilizar sua forma β -pregueada e, com isso, acelerar a fibrilogênese (Figura 1.9) (Matsuzaki, 2007; Yanagisawa, 2007).

Este efeito, no entanto, é dependente de um *clustering* de diversas moléculas de GM1 em um mesmo microdomínio enriquecido em colesterol (*raft*) (Matsuzaki, 2007; Yanagisawa, 2007). McLaurin e colaboradores (1998), no entanto, sugerem que este efeito seja dependente do pH e da força iônica do meio, podendo o GM1, em determinadas situações, estabilizar a forma β -pregueada (e assim acelerar a fibrilogênese) ou, paradoxalmente, favorecer a forma α -helicoidal do peptídeo (e assim dificultar sua agregação). Há, porém, bons indícios corroborando a importância da

interação do β -amilóide com um *cluster* de GM1 ($\text{GA}\beta$), uma vez que anticorpos dirigidos contra esta forma ligada do peptídeo (anti- $\text{GA}\beta$) seriam capazes de bloquear a formação de fibrilas (Matsuzaki, 2007; Yanagisawa, 2007).

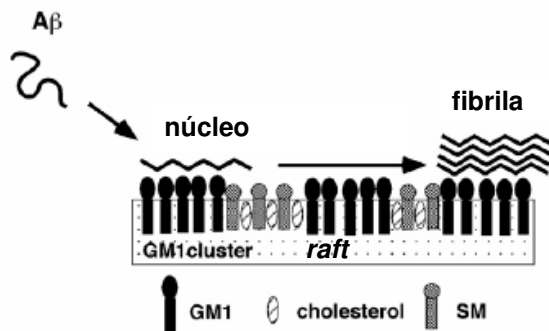


Figura 1.9: Mecanismo de fibrilação do β -amilóide a partir de sua interação com GM1 de membrana: A interação do β -amilóide ($\text{A}\beta$) com um cluster de GM1 presente nos *rafts* induz uma alteração de sua conformação para forma β -pregueada, o que aceleraria o processo de fibrilogênese. SM=esfingomielina (Adaptado de Matsuzaki, 2007).

Por outro lado, há uma série de trabalhos que propõem ao gangliosídeo GM1 um efeito neuroprotetor em modelos *in vitro* da doença de Alzheimer (Sokolova et al., 2007). Também há relatos de que a administração de GM1 a pacientes com suposta doença de Alzheimer promoveria uma melhora considerável no desempenho cognitivo dos mesmos (Svennerholm et al., 2002).

Estudos em animais sadios demonstraram haver um aumento no *clustering* de GM1 com o avanço da idade, sugerindo que esta alteração poderia em parte explicar a maior formação de placas senis em indivíduos de idade avançada (Yamamoto et al., 2008). Por outro lado, análise *post-mortem* de cérebro de indivíduos acometidos pela DA revelaram uma redução global no conteúdo dos diferentes gangliosídios cerebrais, o que poderia ser decorrência da perda neural ou indicar que em seus estágios terminais, parte dos efeitos deletérios da DA sejam decorrência de uma desestruturação das membranas biológicas e de uma redução em seu conteúdo de gangliosídios (Svennerholm and Gottfries, 1994).

Estudos da participação de outros gangliosídios no desenvolvimento da DA são menos freqüentes, porém alguns trabalhos demonstram haver um aumento no

conteúdo de GM2 e GM3 nos *rafts* lipídicos em modelo murino transgênico de doença de Alzheimer (Barrier et al., 2007). O GM3, como discutido anteriormente, é um gangliosídeo pró-apoptótico, de forma que esta alteração pode estar envolvida nos danos neurológicos que culminam em perda neural.

Assim sendo, ainda é inconclusiva a relação entre a expressão de gangliosídeos e a DA, uma vez que os dados da literatura não nos permitem avaliar até que ponto as alterações lipídicas observadas seriam uma decorrência da doença, ou um efeito prévio e, talvez, predisponente ao desenvolvimento da mesma.

2. OBJETIVOS

Considerando o até então apresentado, o primeiro objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do peptídeo β -amilóide A β 25-35, em suas formas fibrilada e não-fibrilada, sobre a biossíntese dos gangliosídios em fatias hipocâmpais de ratos mantidas em cultura organotípica, usando a marcação metabólica com D-[1C¹⁴] galactose.

Além disso, considerando a discrepância nos dados referentes à participação do gangliosídio GM1 na DA (ora mencionado como neuroprotetor, ora mencionado como acelerador da progressão da patologia), o segundo objetivo foi analisar o efeito de um tratamento das fatias hipocâmpais com GM1 sobre a toxicidade induzida pelo β -amilóide. Para tanto, foi avaliado o percentual de morte por necrose e a ativação/inativação da via de sinalização GSK3 β , a qual, em modelos de doença de Alzheimer, está associada à morte celular.

3. RESULTADOS

Os resultados desta dissertação serão apresentados na forma de minuta de um manuscrito de artigo científico, a ser submetido à revista *Neurochemistry International*, cujas instruções encontram-se no anexo (item 7).

β -amyloid Induced Effect on Ganglioside Biosynthesis and the Neuroprotective Effect of GM1

Fernando Kreutz, Rudimar L. Frozza, Ana Carolina Breier, Valeska A. de Oliveira, Ana Paula Horn, Carlos Alexandre Netto, Christianne G. Salbego, and 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

Correspondence to: Dra Vera M. 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
Email: vmtt@ufrgs.br

Abstract

In the present study we have investigated the effect of A β 25-35 peptide, in its fibrillar and non-fibrillar form, upon the ganglioside biosynthesis in a model of hippocampal organotypic cultures. The gangliosides were endogenously labeled with D-1[C^{14}] galactose. Our results demonstrated an A β 25-35 induced alteration on ganglioside biosynthesis, an effect which seemed to be dependent on the peptide fibrillation state. Therefore, the fibrillar A β 25-35 caused an increase on GM3 biosynthesis and a reduction on GD1b biosynthesis, whereas the non fibrillar form of this peptide was able to enhance the synthesis of GM1 ganglioside. To further investigate the role of GM1 in our model, we have performed some experiments in order to test a possible neuroprotective effect of this ganglioside. As a result, a pre-treatment of the hippocampal slices with 10 μ M GM1 was able to prevent the toxicity triggered by the fibrillar β -amyloid peptide, when measured by propidium iodide uptake protocol. With the purpose of corroborating its neuroprotective action, as well as to investigate a possible mechanism by which GM1 could promote neuroprotection, we have analyzed the effect of GM1 treatment (1h, 6h, 12h and 24h) upon the amyloid-induced alterations in GSK3 β phosphorylation/activation state. Our results demonstrated an important effect of GM1 after 24h incubation, since it was able to reverse the amyloid-induced dephosphorylation (activation) of GSK3 β , a signalling pathway involved in apoptosis triggering and neuronal death in models of Alzheimer disease. Taken together, our results provide new and important support for the ganglioside participation in Alzheimer models, and suggest a protective role of GM1 on the amyloid induced toxicity, which, in the future, could expand the therapeutic strategy available for Alzheimer treatment.

Keywords: Alzheimer's disease; β -amyloid; Organotypic culture; Gangliosides; GM1; neuroprotection, GSK3 β

Introduction

Gangliosides compose a large family of glycosphingolipids, structurally characterized by a ceramide hydrophobic core linked to an oligosaccharide chain, which normally contains at least one sialic acid residue. They are synthesized at the Golgi apparatus through sequential glycosylation and sialylation of a glucosylceramide moiety (Tettamanti, 2004).

Gangliosides correspond to around 10% of the brain membrane lipid content, and represent the functional lipid component of the membrane rafts. So, gangliosides 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. This large plethora of effects reflects and depends on the expressed ganglioside profile, the localization and organization of these lipids inside and across the membrane, as well as the biological moment during which they are expressed. (Svennerholm, 1980; Vyas and Schnaar, 2001; Mocchetti et al., 2005; Ichikawa et al., 2009; Lopez and Schnaar, 2009).

Taking this into account, little alterations in ganglioside profile and/or distribution could bring about effects on cellular biology, and so it could participate in the development and evolution of a large sort of diseases. We have previously demonstrated alterations in ganglioside profile and/or distribution in models of hypoxia ischemia (Trindade et al., 2001; Ramirez et al., 2003), organic acidurias (Trindade et al., 2002), hypermethioninemia (Stefanello et al., 2007) and hyperprolinemia (Vianna et al., 2008). Several other studies have attributed to gangliosides a participation in the development of neurodegenerative disorders like Alzheimer disease (Ariga et al., 2008). Nevertheless, the real role of these lipids in these diseases outcome remains little understood.

Alzheimer disease is a neurodegenerative disorder characterized by a progressive and still irreversible cognitive loss. Although it was firstly described in 1906, little is known about its pathogenesis. One of the main proposed hypotheses is the amyloid cascade, which consists in the production and extracellular deposition of a β -amyloid peptide. The produced peptide may remain in a soluble form (monomer, dimer or oligomer) or follow on a polymerization process which involves the formation of peptide insoluble fibril forms. Although the fibrils represent the preferential form of β -amyloid deposition and the main component of the senil plaques

(a classic histopathology marker of Alzheimer disease), both insoluble and soluble forms of the peptide are potentially neurotoxic. However, the exact mechanisms which regulate the β -amyloid formation, as well as the mechanisms involved in the cellular response against this peptide are still unclear (Suh and Checler, 2002; Pimplikar, 2009).

Since the production of a β -amyloid peptide occurs on the biological membranes, and taking into account the occurrence of an interaction between β -amyloid and GM1 ganglioside, which in turn could facilitate or even accelerate the fibril formation, a multiple number of researchers has proposed a positive relationship between GM1 expression and the amyloid cascade processing (Matsuzaki, 2007; Yanagisawa, 2007). On the other hand, a similarly number of studies suggests a neuroprotective role for GM1 in several disease models (Krajnc et al., 1994, Lazzaro et al., 1994; Augustinsson et al., 1997; Svennerholm et al., 2002; Sokolova et al., 2007).

Several studies have proposed a pivotal role for GSK3 β signalling pathway in the development and in the neuronal death observed in Alzheimer disease (Hooper et al., 2008; Hernández et al., 2009a;b). It was shown an amyloid induced activation (dephosphorylation) of GSK3 β in some experimental models, and a correlation between its activity and the neurotoxicity triggered by this peptide. For this reason, Koh et al. (2008) propose the analysis of GSK3 β phosphorytion state (activation state of the enzyme) as a biochemical parameter in the investigation of possible neuroprotective drugs.

Thus, our objectives in this study were to investigate a possible effect of β -amyloid treatment on ganglioside synthesis, as well as to contribute with the elucidation of GM1 ganglioside effect (neuroprotective or not) on the amyloid-induced toxicity, accessing cellular viability (PI uptake protocol) and GSK3 β signalling pathway.

1. Experimental procedures

1.1. Materials

Acrylamide, bisacrylamide, SDS and β -mercaptoethanol used in sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA) as well as A β 25–35, propidium iodide (PI), standard glycolipids and the ganglioside GM1 used in culture incubation. Polyclonal antibodies were purchased from Cell Signalling Technology (Beverly, MA, USA). Anti-rabbit IgG peroxidase-conjugated and reagents to detect chemiluminescence (ECL) were purchased from Amersham Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ, USA). Millicell culture inserts were obtained from Millipore (Millicell1-CM, 0.4 mm, Millipore1, Bedford, MA, USA), 6-well culture plate were from Cell Culture Cluster (Costar1, New York, NY, USA). Culture medium, HBSS, fungizone and horse serum heat inactivated were obtained from GIBCO (Grand Island, NY, USA). Gentamicine was from Schering–Plough (Rio de Janeiro, Brazil). D-[1-¹⁴C] galactose (57mCi/mmol) was obtained from Amersham Life Science (Buckinghamshire, UK). Silicagel high performance thin layer chromatography (HPTLC) plates were supplied by Merck (Darmstadt, Germany). All other chemicals and solvents used were of analytical grade.

1.2. Organotypic hippocampal slice cultures

All animal use procedures were approved by local Animal Care Committee and were in accordance with the NIH Guide for the care and use of laboratory animals. Organotypic hippocampal slice cultures were prepared according to the method of Stoppini et al. (1991), with modifications (Valentim et al., 2003; Cimarosti et al., 2005; Horn et al., 2005). Briefly, 400 μ m thick hippocampal slices were prepared from 6 to 8-days-old male Wistar rats using a McIlwain tissue chopper and separated in ice-cold Hank's balanced salt solution (HBSS) composed of (mM): glucose 36, CaCl₂ 1.26, KCl 5.36, NaCl 136.89, KH₂PO₄ 0.44, Na₂HPO₄ 0.34, MgCl₂ 0.49, MgSO₄ 0.44, HEPES 25; fungizone 1% and gentamicine 36 μ g/100 mL, pH 7.2. The slices were placed on Millicell culture insert and the inserts were transferred to a 6-well culture plate. Each well contained 1 mL of tissue culture medium consisting of 50% minimum essential medium, 25% HBSS, 25% heat inactivated horse serum supplemented with (mM, final concentration): glucose 36, HEPES 25 and NaHCO₃ 4; fungizone 1% and gentamicine

36 µg/100 mL, pH 7.3. Organotypic cultures were maintained in a humidified incubator gasified with 5% CO₂ atmosphere at 37°C for 30 days. Culture medium was changed three times a week.

1.3. Aβ_{25–35} peptide preparation and culture treatments

Aβ_{25–35} stock solutions of 1.5 mM were prepared in sterile distilled water, stored at - 20°C. To obtain the fibrillar form of β-amyloid peptide, an aliquot of the stock solution was incubated under 37°C during the 4 days preceding its use in culture (Casal et al., 2004). The so-called non-fibrillar β-amyloid corresponds to the peptide that has not been subjected to the aforementioned activation process, so being added to the culture directly from stock solution. On the 28th in vitro day, the medium was replaced by a serum free medium in which it was added 25 µM of fibrillar/non-fibrillar Aβ_{25–35} or not (control slices). Previous experiments showed that this concentration (25 µM) of Aβ had the most toxic effect (data not shown), at least for the fibrillar peptide form.

1.4. Quantification of cellular death

Cellular damage was assessed by fluorescent image analysis of propidium iodide (PI) uptake (Noraberg et al., 1999). One hour before the end of the treatments, which means after 48 hours of Aβ_{25–35} exposition 7.5 µM of PI was added to the medium. PI uptake is indicative of significant membrane injury (Macklis and Madison, 1990). Cultures were observed with an inverted microscope (Nikon Eclipse TE 300) using a standard rhodamine filter set. 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 slice area to obtain the percentage of damage (Valentim et al., 2003).

1.5. Metabolic ganglioside labeling

On the 29th in-vitro day, D-[1-C¹⁴] galactose was added to the serum free culture medium, at a final concentration of 1 µCi/ml, and the slices were maintained incubated during the last 24 hours of culture. Subsequent to the death analysis, the slices were

removed from the plates, washed three times with PBS buffer, and submitted to lipid extraction protocol.

1.6. Lipid extraction

Each two washed slices were submitted to lipid extraction using sequentially the mixture of chloroform:methanol (C:M 2:1, v/v) and chloroform:methanol (C:M 1:2, v/v). The C:M extracts were combined and this pool was directly freed from water-soluble contaminants by passing through a Sephadex G-25 column equilibrated in C:M:Water (60:30:4.5) (Rosales-Fritz et al., 1997; Andrade et al., 2003).

1.7. Chromatography and fluorography

The purified lipid extracts (+3,000 cpm) were evaporated under N₂ and run (+2,000 cpm), on HPTLC silica gel 60 plates (Merck), with two successive solvent systems: first, chloroform/methanol (4:1, v/v) and second, chloroform/methanol/0.25%aqueous CaCl₂ (60:36:8, v/v). The second migration was run in a TLC tank designed by Nores et al. (1994). Radioactive glycosphingolipids were visualized by exposition of a radiographic film (Kodak X-Omat AR) at -80°C, usually during three weeks, and their relative contribution was determined by densitometric scanning of the X-ray film in a Geliance 600 Image System (PerkinElmer, USA). Standard gangliosides were visualized by exposure to resorcinol-HCl (Svennerholm, 1957; Lake and Goodwin, 1976).

1.8. GM1 ganglioside culture treatments

GM1 solution was prepared in a sterile saline buffer. In order to investigate the effect of this ganglioside on the amyloid-induced toxicity, a volume of this solution was added to the medium (at a final concentration of 10 µM) 48h before β-amyloid peptide, and again at the moment of β-amyloid incubation (Guidoni et al., 1989). 48 hours after the peptide incubation, slices were submitted to death analysis by IP uptake. For western-blot analysis of signalling proteins, culture slices were treated with GM1 (10µM) and/or fibrillar Aβ₂₅₋₃₅ (25µM) during 1, 6, 12, or 24 hours, but in a way assuring a final culture time of 30 days.

1.9. Western blotting assay

After obtaining the fluorescent images of death, slices were homogenized in lysis buffer (4% sodium dodecylsulfate, 2.1 mM EDTA, 50 mM Tris). Aliquots were taken for protein determination and β -mercaptoethanol was added to a final concentration of 5% in order to prevent protein oxidation. Samples containing 35 μ g of protein were resolved by 10% SDS-PAGE. Proteins were electro transferred to nitrocellulose membranes using a semi-dry transfer apparatus (Bio-Rad, Trans-Blot SD). After 2 h incubation at 4°C in blocking solution containing 5% non-fat milk and 0.1% Tween-20 in Tris-buffered saline (TBS; 50 mM Tris-HCl, 1.5% NaCl, pH 7.4), membranes were incubated overnight with the appropriate primary antibody diluted in the same blocking solution. Primary antibodies against the following proteins were used: anti-phospho GSK-3 β (Ser9) (pGSK-3 β , 1:1000), anti-GSK-3 β (1:1000), and anti- β -actin (1:1000). The membranes were then incubated with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody (1:1000). The chemiluminescence (ECL) was detected using X-ray films (Kodak X-Omat). Films were scanned and the percentage of band intensity was analyzed using Optiquant software (Packard Instrument). For each experiment, the test groups (treated with GM1, fibrillar A β 25–35, or simultaneously treated with both GM1 and fibrillar A β 25–35), were compared to control cultures (exposed neither to A β 25–35 nor to GM1), which were considered 100%, thus assuring the same signal intensity for control and test groups. Data are expressed as percentage of phosphorylated protein for GSK3 β , which was obtained by the ratio of the phospho-protein (pGSK-3 β) with its whole amount (GSK-3 β) (Frezza et al., 2009). Protein contents were measured by the method of Peterson (1997). In order to normalize the value of protein, we detected β -actin in the same analysis.

1.10. Statistical analysis

Data are expressed as mean + S.D. One-way or two-way analysis of variance (ANOVA) was applied to the means to determine statistical differences between experimental groups. Post hoc comparisons were performed with Tukey test for multiple comparisons. Differences between mean values were considered significant when $p < 0.05$.

2. Results

2.1. Toxicity induced by the different A β 25-35 peptide forms in organotypic hippocampal slice cultures

Exposition of cultures to the fibrillar form of A β 25-35 peptide (25 μ M) caused a marked fluorescence in the hippocampal slices after 48h treatment, indicating a high incorporation of PI, which in turn means an increase in the cellular necrotic death process by this peptide form. On the other hand, the non-fibrillar form of A β 25-35 peptide (25 μ M) caused no significant death increase in the culture slices, as presented in the same photomicrograph in Fig. 1A. The quantification of the photomicrographs is represented in Fig. 1B.

2.2. A β 25-35 effects upon ganglioside biosynthesis

Although neither the fibrillar nor the non-fibrillar β -amyloid forms was able to carry out an alteration in the total radiolabeling (Fig.2), the chromatographic and densitometric analysis revealed a distinct effect of the different peptide forms on the profile and distribution of expressed gangliosides. While the non-fibrillar β -amyloid caused a significant increase in GM1 biosynthesis, the fibrillar form of this peptide prompt an increase in GM3 (p<0.05) and a reduction in GD1b (p<0.05) ganglioside expression (Fig. 3 and 4).

2.3 Investigation of GM1 neuroprotective effect on the amyloid-induced death

Taking into account the literature data that propose a GM1 neuroprotective effect on so many different experimental models, we have decided to investigate the GM1 effect on the β -amyloid toxicity observed in our own model. Since we have observed a significant toxicity just for the fibrillar β -amyloid, we have chosen this peptide form for the experiments of neuroprotection.

As can be notice in Fig. 5, treatment of culture slices with 10 μ M GM1, 48 hours prior to amyloid and during the 48 hours of this peptide incubation, was able to significantly prevent the peptide-induced toxicity, when measured by PI uptake.

2.4. Effect of GM1 upon fibrillar β -amyloid-induced alteration of GSK3 β phosphorylation state

To further investigate the possible neuroprotective effect of GM1 on our model, as well as to evaluate a possible signalling mechanism involved in it, we analyzed GM1 effect upon A β -induced alteration on the GSK3 β phosphorylation state after 1, 6, 12 and 24 hours. Our results show no effect of GM1 or fibrillar A β 25-35 treatment after one hour of treatment. Nevertheless, 6h co-treatment with GM1 and A β 25-35 caused a significant increase in phosphorylation. And, surprisingly, the 12h treatment showed a GM1-induced decrease ($p < 0.05$) in GSK3 β phosphorylation state. The most interesting effect, however, was observed in the 24h treatment, in which GM1 was able to rise GSK3 β phosphorylation and co-treatment with GM1 and A β 25-35 was able to reverse the amyloid-induced reduction in GSK3 β phosphorylation state (Fig.6).

3. Discussion

β -Amyloid peptide represents the major component of senile plaques, a histopathology marker of Alzheimer disease. Although it is not the only biochemical alteration observed in Alzheimer, the production of a amyloid peptide, which may remain in soluble forms or be converted into insoluble ones (fibrils), seems to exert a pivotal or even causal role in the disease development/progression (Suh and Checler, 2002; Wash and Selkoe, 2007).

The natural β -amyloid peptides are composed of 39 to 43 amino acid residues. Nevertheless, their shorter synthetic analogous, A β 25-35, which contains the amino acid sequence 25-35 of its natural counterparts, seems to trigger similar toxicity mechanisms (El Khoury et al., 1996; Yan et al., 1996; Guan et al., 2001; Qui et al., 2005; Frozza et al., 2009) and, just as the natural β -amyloid peptides, is able to aggregate into fibrils (Kowall et al., 1992). Consequently, A β 25-35 is a convenient tool for the investigation of neurotoxic mechanisms involved in Alzheimer disease.

Taking into account a lot of studies suggesting a role of gangliosides and membrane lipid dynamics in the amyloid cascade modulation, as well as a participation of these lipids in the toxicity mechanisms triggered by amyloid peptide, the present study has investigated the effect of A β 25-35, in its fibrillar or non-fibrillar forms, upon ganglioside biosynthesis in a model of hippocampal organotypic cultures.

Organotypic cultures are a good alternative to *in vivo* models, since they provide a good experimental access to mimic pathophysiological pathways in living tissues, and because they preserve the cell organization and tissue architecture (Stoppini et al., 1991; Tavares et al., 2001; Cimarosti et al., 2005; Holopainen, 2005; Horn et al., 2005).

Using this model, we could observe that the β -amyloid induced death was dependent on its fibrillation state, since the non-fibrillar peptide form was unable to trigger toxicity, at least that toxicity measured by PI uptake protocols (Figure 1).

Our results demonstrate an A β 25-35 effect on ganglioside biosynthesis, which seemed to be dependent of the peptide fibrillation state. Whereas fibrillar A β 25-35 caused an increase in GM3 and a decrease in GD1b biosynthesis, its non-fibrillar form was able to enhance GM1 biosynthesis (figure 4).

Seeing that GM3 is a ganglioside normally associated with apoptotic mechanisms, at least when expressed in mature neuronal cells (Sohn et al., 2006;

Valaperta et al., 2006), and taking into account an anti-apoptotic effect attributed to GD1b (Chen et al., 2005), the enhancement in GM3 biosynthesis as well as the decrease in GD1b biosynthesis, as a consequent of fibrillar A β 25-35 incubation, could take part of the toxic mechanisms triggered by this peptide.

GM1, in turn, is a ganglioside normally associated with neuroprotective effects. The exact mechanism involved in this neuroprotection is not completely understood, but GM1 is able to enhance/potentiate the neurotrophin release and action (Rabin et al., 2002; Mocchetti et al., 2005), to exert antioxidant effects (Figuera et al., 2004; Furian et al., 2007; Gavella et al., 2007), to prevent/revert glutamate induced excitotoxicity (Cunha et al., 1999), and to modulate some signalling pathways involved in death/survival processes (Mutoh et al., 1995; Pitto et al., 1998; Duchemin et al., 2002; Lili et al., 2005; Duchemin et al., 2008).

On the other hand, a lot of studies have attributed to GM1 a participation in the mechanisms of β -amyloid fibrillation, seeing that the interaction of the peptide with this ganglioside could act as a seed for the aggregation process, accelerating or even potentiating its fibrillation on membrane surfaces. This effect, however, seems to be dependent of a clustering of this ganglioside into membrane microdomains (lipid rafts) (Matsuzaki, 2007; Yanagisawa, 2007), as well as to be dependent of the pH and ionic concentration of the medium (McLaurin et al., 1998). Besides that, other studies have suggested a participation of GM1 ganglioside in maturation of Amyloid Precursor Protein (APP), affecting its localization on membrane surface, and thence, positively modulating β -amyloid production (Ehehalt et al., 2003; Zha et al., 2004; Zhang et al., 2009).

To further analyze the real role of this ganglioside (neuroprotective or not) in the present model, we have performed experiments consisting in the treatment of slices cultures with a saline GM1 solution, in order to investigate the effect of this ganglioside upon the A β 25-35 induced toxicity. The GM1 concentration used in this experiment was 10 μ M, since literature shows that, in this concentration range, gangliosides would form micelles into water solution, and thus would have a greater ability to be incorporated by biological membranes (Rauvala, 1979; Ulrich-Bott and Wiegandt, 1984). Considering that just the fibrillar A β 25-35 was able to trigger toxicity in our model, we have chosen this peptide form to perform the neuroprotective investigation. The pre-treatment of slices with 10 μ M GM1, 48 hours previous to A β 25-35 addition,

was able to significantly prevent the amyloid toxicity measured after 48 hours of amyloid incubation, as the PI uptake experiments have demonstrated (Figure 5).

Several studies have proposed a link among amyloid toxicity, Alzheimer development, and the activation of the GSK3 β signalling pathway. This signalling pathway exerts an important effect over neurons, triggering the activation of death processes that could include oxidative stress induction and apoptosis response activation. In models of Alzheimer disease, GSK3 β signalling pathway, besides its effect on apoptotic triggering, could represent a link between amyloid production/fibrillation and the posterior hyper-phosphorylation of Tau protein, which in turn evolves to the development of other important histopathology marker of Alzheimer disease, namely the neurofibrillary tangles (Hooper et al., 2008; Hernández et al., 2009a;b). Thence, there are researches proposing the analysis of GSK3 β activation, which is measured by its phosphorylation state (since this enzyme seems to be inactive when phosphorylated), as a biochemical marker for the study of neuroprotective drugs. So, drugs which could inhibit the β -amyloid induced activation of GSK3 β could be considered as potential neuroprotective ones (Koh et al., 2008).

Thus, in order to further analyze the neuroprotective potential of GM1 in our model, and to propose a possible way by which this ganglioside could trigger its neuroprotective action, we have investigated the effect of GM1, in a 10 μ M concentration, upon the amyloid induced alterations of GSK3 β phosphorylation state (Figure 6). Although the 1 hour incubation has demonstrated no alteration of GSK3 β phosphorylation, neither with GM1 nor A β 25-35, a longer treatment, during 6 hours, has showed that a co-treatment with GM1 and A β 25-35 is able to enhance the phosphorylation of GSK3 β . A 12 hour treatment with GM1 trigger a decrease in GSK3 β phosphorylation. Most importantly, however, we have observed that GM1 was able to reverse the activation (or dephosphorylation) of GSK3 β ($p < 0.05$) observed after 24 hours of A β 25-35 incubation.

Taken together, our results firstly demonstrate a direct effect of a natural β -amyloid peptide analogue on ganglioside synthesis, which seems to be dependent of its fibrillation state.

We also demonstrated a potential neuroprotective effect of GM1 ganglioside, which suggests that the amyloid-induced alterations in ganglioside expression really could affect cell viability and the tissue response against the peptide induced insult.

Taking this into account, we propose that the GM1 synthesis enhancement triggered by non-fibrillar amyloid peptide could represent a short-term way of neuroprotective response of the tissue, although in long run, we could not rule out the hypothesis that this ganglioside alteration could facilitate a future aggregation of the non-fibrillar peptide into its more toxic fibril forms.

Although the clinical use of GM1 ganglioside as a neuroprotective drug could be made difficult because of its low bioavailability into CNS (Orlando et al., 1979; Ghidoni et al., 1989), as well as because the associated risk in triggering autoimmune diseases (Guillain Barré Syndrome) (Govoni et al., 1997; Kuwabara, 2007), the recent development of synthetic GM1 analogues, with improved pharmacokinetic properties and maybe with a better clinical security, could, in the future, expand the available therapeutic strategies for Alzheimer disease treatment (Polo et al., 1994; Wells et al., 1996; Bachis et al., 2002; Wu et al., 2005; Biraboneye et al., 2009).

Acknowledgements

This work was supported by grants from PRONEX-FAPERGS, PIBIC-CNPq/UFRGS, CNPq and IBNET. The authors wish to thank to Mrs L.R. Blazina (Dep. Bioquímica, ICBS, UFRGS) for technical assistance in culture material preparation, to the students F.R. Machado, J.B. Pinto, M. Terra, and S. Terra for technical assistance in some experiments, to PhD Fátima T.C.R. Guma for kindly gifting the GM1 ganglioside, to PhD L.F. Pettenuzzo for helpful with statistical analysis.

References

- Andrade, C.M.B., Trindade, V.M.T., Cardoso, C.C.A., Ziulkoski, A.L., Trugo, L.C., Guaragna, R.M., Borojevic, R., Guma, F.C.R., 2003. Changes of sphingolipid species in the phenotypeconversion from myofibrilblasts to lipocytes in hepaticstellate cells. *Journal of Cellular Biochemistry* 88, 533-544.
- Ariga, T., McDonald, M.P., Yu, R.K., 2008. Role of ganglioside metabolism in the pathogenesis of Alzheimer's disease--a review. *Journal of Lipid Research*. 49(6), 1157-1175.
- Augustinsson, L. E., K., Blennow, C., Blomstrand, G., Brane, R., Ekman, P., Fredman, I., Karlsson, M., Kihlgren, W., Lehmann, A., Lekman, 1997. Intracerebroventricular administration of GM1 ganglioside to presenile Alzheimer patients. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders* 8, 26–33.
- Bachis, A., Rabin, S.J., Fiacco, M., Mocchetti, I., 2002. Gangliosides Prevent Excitotoxicity Through Activation of TrkB Receptor. *Neurotoxicity Research*, 4 (3), 225-234.
- Biraboneye, A.C., Madonna, S., Laras, Y., Krantic, S., Maher, P., Kraus, J.L., 2009. Potential Neuroprotective Drugs in Cerebral Ischemia: New Saturated and Polyunsaturated Lipids Coupled to Hydrophilic Moieties: Synthesis and Biological Activity. *Journal of Medicinal Chemistry* DOI:10.1021/jm900227u
- Casal, C., Serratos, J., Tussel, J.M., 2004. Effects of β -AP peptides on activation of the trasncription factor NF-kappaB and in cell proliferation in glial cell cultures. *Neuroscience Research* 24, 233-238.
- Chen, X., Chi, S., Liu, M., Yang, W., Wei, T., Qi, Z., Yang, F., 2005. Inhibitory effect of ganglioside GD1b on K⁺ current in hippocampal neurons and its involvement in apoptosis suppression. *Journal of Lipid Research* 46(12),2580-2585.
- Cimarosti, H., Zamin, L.L., Frozza, R., Nassif, M., Horn, A.P., Tavares, A.,Netto, C.A., Salbego, C., 2005. Estradiol protects against oxygen and glucose deprivation in rat hippocampal organotypic cultures and activates Akt and inactivates GSK-3 β . *Neurochemical Research* 30, 191–199.
- Cunha, G.M., Moraes, R.A., Moraes, G.A., França, M.C. Jr, Moraes, M.O., Viana, G.S., 1999. Nerve growth factor, ganglioside and vitamin E reverse glutamate cytotoxicity in hippocampal cells. *European Journal of Pharmacology* 367(1), 107-112.

- Duchemin, A.M., Qun, R., Lili, M., Norton, H.N, Hadjiconstantinou, M., 2002. GM1 ganglioside induces phosphorylation and activation of Trk and Erk in brain. *Journal of Neurochemistry* 81, 696–707.
- Duchemin, A.M., Qun, R., Norton, H.N, Hadjiconstantinou, M., 2008. GM1-induced activation of phosphatidylinositol 3-kinase: involvement of Trk receptors. *Journal of Neurochemistry* 104, 1466-1477.
- El Khoury, J., Hickman, S.E., Thomas, C.A., Cao, L., Silverstein, S.C., Loike, J.D., 1996. Scavenger receptor-mediated adhesion of microglia to beta amyloid fibrils. *Nature* 382, 716–719.
- Ehehalt, R.; Keller, P.; Haass, C.; Thiele, C.; Simons, K., 2003. Amyloidogenic processing of the Alzheimer-amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *The Journal of Cell Biology*. 160 (1): 113–123.
- Figuera, M.R., Bonini, J.S., Frussa-Filho, R., Dutra-Filho, C.S., Hagen, M.E., Rubin, M.A., Mello, C.F., 2004. Monosialoganglioside increases catalase activity in cerebral cortex of rats. *Free Radical Research* 38(5), 495-500.
- Frezza, R.L., Horn, A.P., Hoppe, J.B., Simão, F., Gerhardt, D., Comiran, R.A., Salbego, C.G., 2009. A Comparative Study of β -Amyloid Peptides A β 1-42 and A β 25-35 Toxicity in Organotypic Hippocampal Slice Cultures. *Neurochemical Research* 34, 295–303.
- Furian, A.F., Oliveira, M.S., Royes, L.F., Fiorenza, N.G., Figuera, M.R., Myskiw, J.C., Weiblen, R., Rubin, M.A., Frussa-Filho, R., Mello, C.F., 2007. GM1 ganglioside induces vasodilation and increases catalase content in the brain. *Free Radical Biology and Medicine* 43(6), 924-932.
- Gavella, M., Kveder, M., Lipovac, V., Jurasin, D., Filipovi-Vincekovic, N., 2007. Antioxidant properties of ganglioside micelles. *Free Radical Research* 41(10), 1143-1150.
- Ghidoni, R., Fiorilli, A., Trinchera, M., Venerando, B., Chigorno, V., Tettamanti, G., 1989. Uptake, cell penetration and metabolic processing of exogenously administered GM1 ganglioside in rat brain. *Neurochemistry International* 15, 455-465.
- Govoni, V., Granieri, E., Tola, M.R., Paolino, E., Casetta, I., Fainardi, E., Monetti, V.C., 1997. Exogenous gangliosides and Guillain-Barré syndrome. An observational study in the local health district of Ferrara, Italy. *Brain* 120(7), 1123-1130.

- Guan, Z.Z., Miao, H., Tian, J.Y., Unger, C., Nordberg, A., Zhang, X., 2001. Suppressed expression of nicotinic acetylcholine receptors by nano molar beta-amyloid peptides in PC12 cells. *Journal of Neural Transmission* 108, 1417–1433.
- Hernández, F., de Barreda, E.G., Fuster-Matanzo, A., Goñi-Oliver, P., Lucas, J.J., Avila, J., 2009a. The role of GSK3 in Alzheimer disease. *Brain Research Bulletin* 80, 248–250.
- Hernández, F., Barreda, E.G., Fuster-Matanzo, A., Lucas, J.J., Avila, J., 2009b. GSK3: A possible link between beta amyloid peptide and tau protein. *Experimental Neurology*. Article *in Press*. doi:10.1016/j.expneurol.2009.09.011
- Holopainen, I.E., 2005. Organotypic hippocampal slice cultures: a model system to study basic cellular and molecular mechanisms of neuronal cell death, neuroprotection, and synaptic plasticity. *Neurochemical Research* 30, 1521–1528.
- Hooper, C., Killick, R., Lovestone, S., 2008. The GSK3 hypothesis of Alzheimer's disease (Minireview). *Journal of Neurochemistry* 104, 1433–1439.
- Horn, A.P., Gerhardt, D., Geyer, A.B., Valentim, L., Cimarosti, H., Tavares, A., Horn, F., Lenz, G., Salbego, C., 2005. Cellular death in hippocampus in response to PI3-K pathway inhibition and oxygen and glucose deprivation. *Neurochemical Research* 30, 355–361.
- Ichikawa, N., Iwabuchi, K., Kurihara, H., Ishii, K., Kobayashi, T., Sasaki, T., Hattori, N.; Mizuno, Y., Hozumi, K., Yamada, Y., Arikawa-Hirasawa, E., 2009. Binding of laminin-1 to monosialoganglioside GM1 in lipid rafts is crucial for neurite outgrowth. *Journal of Cell Science* 122(2), 2892-2899.
- Koh, S.H., Noh, M.Y., Kim, S.H., 2008. Amyloid-beta-induced neurotoxicity is reduced by inhibition of glycogen synthase kinase-3. *Brain Research* 1188, 254 – 262.
- Kowall, N.W., McKee, A.C., Yankner, B.A., Beal, M.F., 1992. In vivo neurotoxicity of beta-amyloid [beta(1–40)] and the beta(25–35) fragment. *Neurobiology Aging*. 13 (5), 537–542.
- Krajnc, D., Wemlinger, T.A., Neff, N.H., Hadjiconstantinou, M., 1994. Neonatal hypoxia: early neurotransmitter responses and the consequences of treatment with GM1 ganglioside. *Journal Pharmacology Experimental Therapeutics* 271: 1299-1305.
- Kuwabara, S., 2007. Guillain-Barré syndrome. *Current Neurology and Neuroscience Reports*. 7, 57-62.

- Lake, B.D., Goodwin, H.J., 1976. Lipids. In: Smith I, Seakins JWT, editors. Chromatographic and eletrophoretic. London;William Heinemann Medical Books Ltd. 345–366
- Lazzaro, A., Seren, M.S., Koga, T., Zanoni, T., Schiavo, N., Manev, H., 1994. GM1 reduces infarct volume after focal cerebral ischemia. *Experimental Neurology* 125, 278-285.
- Lili, M., Qun, R., Duchemin, A.M., Neff, N.H., Hadjiconstantinou, M., 2005. GM1 and ERK signalling in the aged brain. *Brain Research* 1054, 125 – 134
- Lopez, P.H.H., Schnaar, R.L., 2009. Gangliosides in cell recognition and membrane protein regulation. *Current Opinion in Structural Biology* 19(5), 549-557.
- Macklis, J.D., Madison, R.D., 1990. Progressive incorporation of propidium iodide in cultured mouse neurons correlates with declining electrophysiological status: a fluorescence scale of membrane integrity. *Journal of Neuroscience Method* 31, 43–46.
- Matsuzaki, K., 2007. Physicochemical interactions of amyloid β -peptide with lipid bilayers (Review). *Biochimica et Biophysica Acta* 1768(8), 1935-1942.
- McLaurin, J., Franklin, T., Fraser, P.E., Chakrabartty, A., 1998. Structural transitions associated with the interaction of Alzheimer β -amyloid peptides with gangliosides. *Journal of Biological Chemistry* 273, 4506-4515.
- Mocchetti, I., 2005. Exogenous gangliosides, neuronal plasticity and repair, and the neurotrophins (Review). *Cellular and Molecular Life Sciences* 62, 2283-2294.
- Mutoh, T., Tokuda, A., Miyadai, T., Hamaguchi, M., Fujiki, N., 1995. Ganglioside GM1 binds to the Trk protein and regulates receptor function. *Cell Biology* 92, 5087-5091.
- Noraberg, J., Kristensen, B.W., Zimmer, J., 1999. Markers for neuronal degeneration in organotypic slice cultures. *Brain Research Protocols* 3(3), 278-290.
- Nores, G.A., Mitzumari, R.K., Kremer, D.M., 1994. Chromatographic tank designed to obtain highly reproducible highperformance thin-layer chromatograms of gangliosides and neutral glycosphingolipds. *Journal of Chromatography* 686, 155–157.
- Orlando, P., Cocciantè, G., Ippolito, G., Massari, P., Roberti, S., Tettamanti, G., 1979. The fate of tritium labeled GM1 ganglioside injected in mice. *Pharmacology Research Communications* 11, 759-773.

- Peterson, G.L., 1977. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry* 83(2), 346-356.
- Pimplikar, S.W., 2009. Reassessing the amyloid cascade hypothesis of Alzheimer's disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 41, 1261-1268.
- Pitto, M., Mutoh, T., Kuriyama, M., Ferraretto, A., Palestini, P., Masserini, M., 1998. Influence of endogenous GM1 ganglioside on TrkB activity, in cultured neurons. *FEBS Letters* 439, 93-96.
- Polo, A., Kirschner, G., Guidotti, A., Costa, E., 1994. Brain content of glycosphingolipids after oral administration of monosialogangliosides GM1 and LIGA20 to rats. *Molecular and Chemical Neuropathology* 21, 41-53.
- Qi, X.L., Xiu, J., Shan, K.R., Xiao, Y., Gu, R., Liu, R.Y., Guan, Z.Z., 2005. Oxidative stress induced by beta-amyloid peptide (1-42) is involved in the altered composition of cellular membrane lipids and the decreased expression of nicotinic receptors in human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Neurochemistry International*. 46 (8), 613-621.
- Rabin, S.J., Bachis, A., Mocchetti, I., 2002. Gangliosides Activate Trk Receptors by Inducing the Release of Neurotrophins. *The Journal of Biological Chemistry* 277(51), 49466-49472.
- Ramirez, M.R., Muraro, F., Zylbersztejn, D.S., Abel, C.R., Arteni, N.S., Lavinsky, D., Netto, C.A., Trindade, V.M., 2003. Neonatal hypoxia-ischemia reduces ganglioside, phospholipid and cholesterol contents in the rat hippocampus. *Neuroscience Research* 46(3), 339-47.
- Rauvala, H., 1979. Monomer-micelle transition of the ganglioside GM1 and the hydrolysis by *Clostridium perfringens* neuraminidase. *European Journal of Biochemistry* 97, 555-564.
- Rosales-Fritz, V.M., Daniotti, J.L., Maccioni, H.J.F., 1997. Chinese hamster ovary cells lacking - GM1 and GD1a synthesize gangliosides upon transfection with human GM2 synthase. *Biochimica Biophysica Acta* 1354, 153-158.
- Sohn, H., Kim, Y.S., Kim, H.T., Kim, C.H., Cho, E.W., Kang, H.Y., Kim, N.S., Kim, C.H., Ryu, S.E., Lee, J.H., Ko, J.H., 2006. Ganglioside GM3 is involved in neuronal cell death. *FASEB Journal* 20(8), 1248-1250.
- Sokolova, T.V., Zakharova, I.O., Furaev, V.V., Rychkova, M.P., Avrova, N.F., 2007. Neuroprotective effect of ganglioside GM1 on the cytotoxic action of hydrogen

- peroxide and amyloid beta-peptide in PC12 cells. *Neurochemical Research* 32(8), 1302-1313.
- Stefanello, F.M., Kreutz, F., Scherer, E.B.S., Breier, A.C., Vianna, L.P., Trindade, V.M.T., Wyse, A.T.S., 2007. Reduction of gangliosides, phospholipids and cholesterol content in cerebral cortex of rats caused by chronic hypermethioninemia. *International Journal of Developmental Neuroscience*. 25(7), 473-477
- Stoppini, L., Buchs, P.A., Muller, D., 1991. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *Journal of Neuroscience Methods* 37, 173–182.
- Suh, Y., Checler, F., 2002. Amyloid Precursor Protein, Presenilins, and α -Synuclein: Molecular Pathogenesis and Pharmacological Applications in Alzheimer's Disease (Review). *Pharmacological Review* 54, 469-525
- Svennerholm, L., 1957. Quantitative estimation of sialic acids a colorimetric resorcinol-hydrochloric acid method. *Biochimica et Biophysica Acta* 24, 604–611.
- Svennerholm, L., 1980. Gangliosides and synaptic transmission. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 125, 533-544.
- Svennerholm, L., Brane, G., Darlsson, I., Leckman, A., Ramstrom, I., Wikkelso, C., 2002. Alzheimer disease- effect of continuous intracerebroventricular treatment with GM1 ganglioside and a systematic activation programme. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders* 14, 128-136.
- Tavares, A., Cimarosti, H., Valentim, L., Salbego, C., 2001. Profile of phosphoprotein labelling in organotypic slice cultures of rat hippocampus. *Neuroreport* 12, 2705–2709.
- Tettamanti, G., 2004. Ganglioside/glycosphingolipid turnover: New concepts. *Glycoconjugate Journal* 20, 301–317.
- Trindade, V.M., Daniotti, J.L., Raimondi, L., Chazan, R., Netto, C.A., Maccioni, H.J., 2001. Effects of neonatal hypoxia/ischemia on ganglioside expression in the rat hippocampus. *Neurochemical Research* 26(6), 591-597.
- Trindade, V.M.T., Brusque, A.M., Raasch, J.R., Pettenuzzo, L.F., Rocha, H.P., Wannmacher, C.M.D., Wajner, M., 2002. Ganglioside Alterations in the Central Nervous System of Rats Chronically Injected with Methylmalonic and Propionic Acids. *Metabolic Brain Disease* 17(2), 93-102.
- Ulrich-Bott, B., Wiegandt, H., 1984. Micelle properties of glycosphingolipids in aqueous media. *Journal of Lipid Research* 25, 1233-1245.

- Valaperta, R., Chigorno, V., Basso, L., Prinetti, A., Bresciani, R., Preti, A., Miyagi, T., Sonnino, S., 2006. Plasma membrane production of ceramide from ganglioside GM3 in human fibroblasts. *FASEB Journal* 20(8), 1227-122.
- Valentim, L.M., Rodnight, R., Geyer, A.B., Horn, A.P., Tavares, A., Cimarosti, H., Netto, C.A., Salbego, C.G., 2003. Changes in heat shock protein 27 phosphorylation and immunoccontent in response to preconditioning to oxygen and glucose deprivation in organotypic hippocampal cultures. *Neuroscience* 118, 379–386.
- Vianna, L.P., Delwing, D., Kurek, A.G., Breier, A.C., Kreutz, F., Chiarani, F., Stefanello, F.M., Wyse, A.T., Trindade, V.M., 2008. Effects of chronic proline administration on lipid contents of rat brain. *International Journal of Developmental Neurosciences* 26(6), 567-73.
- Vyas, A.A, Schnaar, R.L., 2001. Brain gangliosides: Functional ligands for myelin stability and the control of nerve regeneration. *Biochimie* 83, 677-682.
- Walsh, D.M., Selkoe, D.J., 2007. A β Oligomers – a decade of discovery. *Journal of Neurochemistry*, 101, 1172–1184.
- Wells, J.N., Ventura, R.F., Eisenhauer, P.B., McKenna, D.C., Fine, R.E., Ullman, M.D., 1996. Transport of GM1 and GM1 inner ester across an in vitro model of the blood-brain barrier. *Neuroscience Letters* 217, 121-124.
- Wu, G., Lu, Z.H., Wang, J., Wang, Y., Xie, X., Meyenhofer, M.F., Ledeen, R.W., 2005. Enhanced susceptibility to kainite-induced seizures, neuronal apoptosis, and death in mice lacking gangliotetraose gangliosides: protection with LIGA20, a membrane-permeant analog of GM1. *Journal of Neurosciences* 25, 11014-11022.
- Yan, S.D., Chen, X., Fu, J., Chen, M., Zhu, H.J., Roher, A., Slattery, T., Zhao, L., Nagashima, M., Morser, J., Migheli, A., Nawroth, P., Stern, D., Schmidt, A.M., 1996. RAGE and amyloid- β peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature* 382, 685–691.
- Yanagisawa, K., 2007. Role of gangliosides in Alzheimer's disease (Review). *Biochimica et Biophysica Acta* 1768(8), 1943-51.
- Zha, Q., Ruan, Y., Hartmann, K., Beyreuther, D., Zhang, D., 2004. GM1 Ganglioside regulates the proteolysis of amyloid precursor protein. *Molecular Psychiatry* 9, 946-952.

Zhang, H., Ding, J., Tian, W., Wang, L., Huang, L., Ruan, Y., Lu, T., Sha, Y., Zhang, D., 2009. Ganglioside GM1 binding the N-terminus of amyloid precursor protein. *Neurobiology of Aging*. 30(8), 1245-1253.

Figure Legends

Figure 1: Toxicity induced by 48 hours exposure of the non-fibrillar and the fibrillar A β 25-35 peptide (25 μ M) in organotypic hippocampal cultures: (A) representative photomicrographs of slices stained with PI at the end of treatment; (B) quantitative analysis of hippocampal damage just after each treatment with non-fibrillar A β 25-35 (Non-fibrillar Abeta) and with fibrillar A β 25-35 (Fibrillar Abeta), respectively. Bars represent the mean + S.D., n=8. (*) Significantly different from control cultures (one-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 non-fibrillar A β 25-35 (Non-fibrillar Abeta), or fibrillar A β 25-35 (Fibrillar Abeta) or not exposed (control). Gangliosides were extracted and purified with sephadex G-25 as described in Material and Methods. Bars represent the mean + S.D., n=8. (one-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 non-fibrillar A β 25-35 (Non-fibrillar Abeta), or fibrillar A β 25-35 (Fibrillar Abeta) or not exposed (control). Gangliosides were extracted, purified with sephadex G-25 and analysed by HPTLC, as described in experimental procedures. The position of co-chromatographed ganglioside standards is indicated. The present results are representative of eight independent experiments.

Figure 4: Ganglioside distribution in organotypic hippocampal slice cultures exposed to non-fibrillar A β 25-35 (Non-fibrillar Abeta), or fibrillar A β 25-35 (Fibrillar Abeta) or not exposed (control). Results correspond to densitometric analysis of 8 HPLC-autoradiography as showed in Figure 3. Result for each ganglioside is expressed as a percentage of the total radioactivity incorporated into all ganglioside bands. Results

are expressed as mean percentage + S.D. (*) Significantly different from control cultures (one-way ANOVA followed by Tukey test, $p < 0.05$).

Figure 5: Effect of GM1 treatment on fibrillar A β 25-35-induced cell death. The slices were treated or not with 10 μ M GM1 from the 26th in vitro day. On the 28th in vitro day, fibrillar A β 25-35 was added to the medium, and cell death was analyzed after 48h of its incubation by PI uptake. Control represents the slices treated with none GM1 neither amyloid-peptide. **(A)** representative photomicrographs of slices stained with PI at the end of treatment; **(B)** quantitative analysis of hippocampal damage. Bars represent the cell death mean + S.D., $n=5$. (*) Significantly different from control cultures, (#) significantly different from A β 25-35 treated slices (two-way ANOVA followed by Tukey test, $p < 0.05$).

Figures 6: Effect of 10 μ M GM1 treatment on fibrillar A β 25-35 induced GSK3 β alteration. **(A)** Representative Western blotting of phospho-GSK3 β and GSK3 β after each treatment; **(B)** histograms representing the quantitative Western blotting analysis of GSK3 β phosphorylation state. The densitometric values obtained to phospho- and total-GSK3 β were first normalized to their respective control. The control values are shown as a horizontal clotted line. Data are expressed as a ratio of the normalized phospho-GSK3 β /GSK3 β relation. Bars represent the mean + S.D, $n = 3$ for 1, 6 and 12h treatments, and $n=5$ for 24h treatment. (*) Significantly different from respective control culture, (#) significantly different from respective fibrillar A β 25-35 treated group (two-way ANOVA followed by Tukey test, $p < 0.05$).

Figure 1

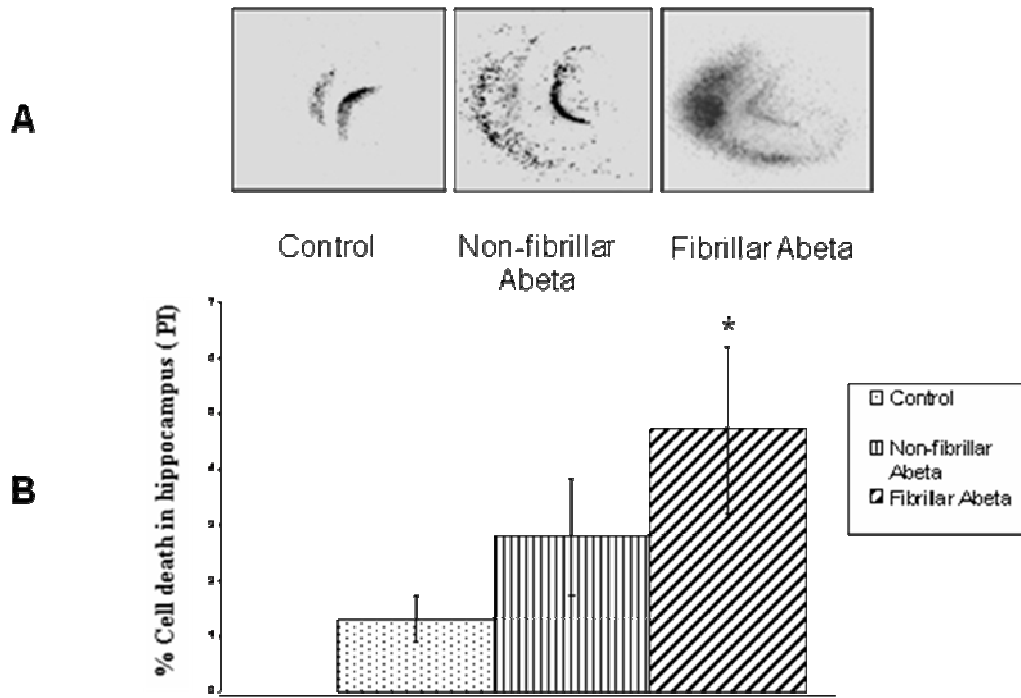


Figure 2

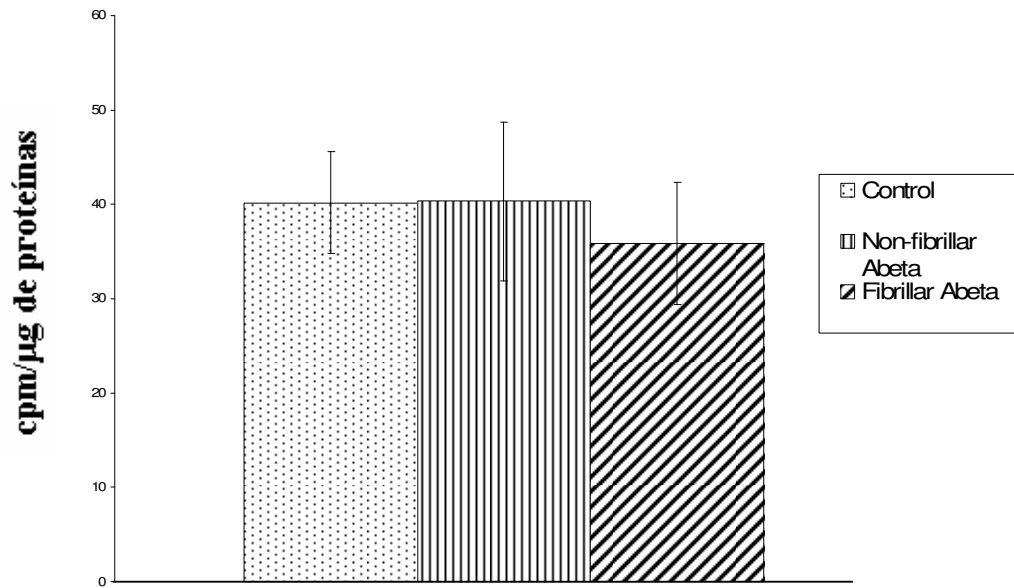


Figure 3

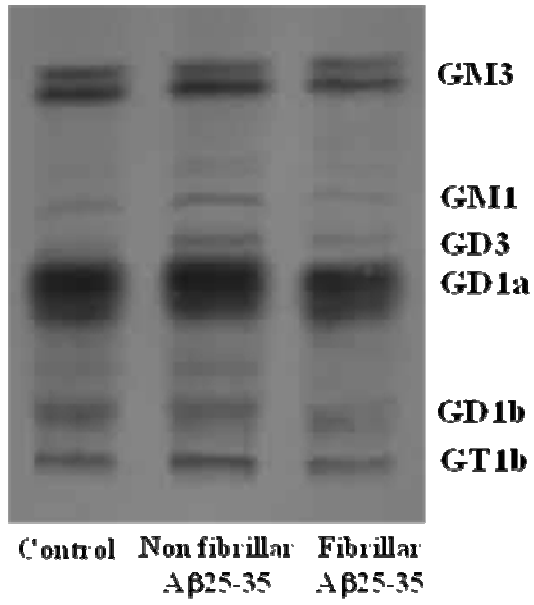


Figure 4

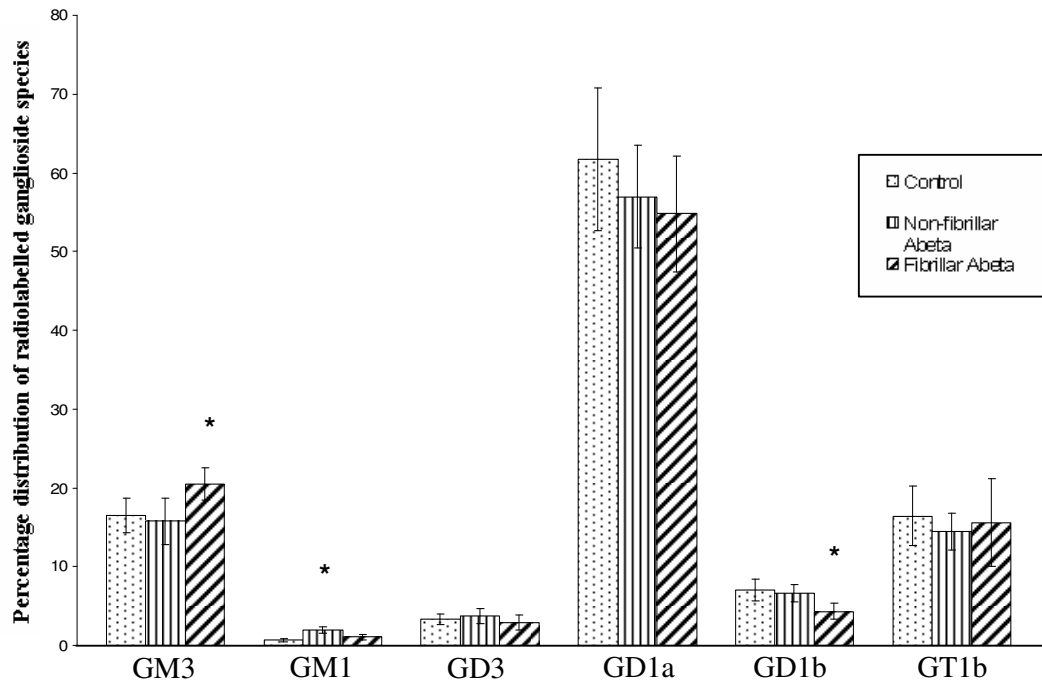


Figure 5

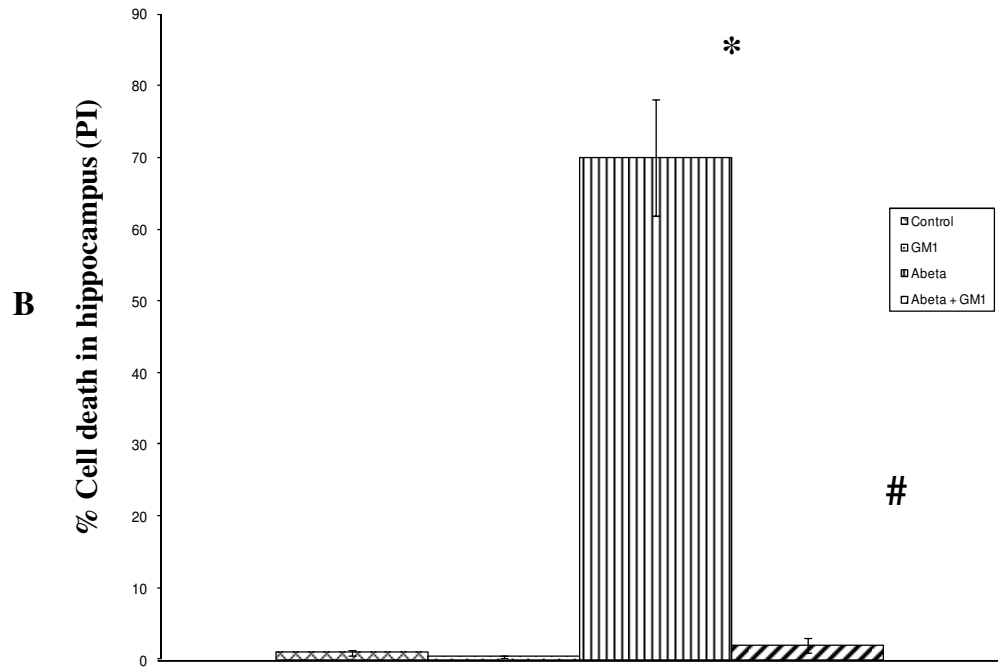
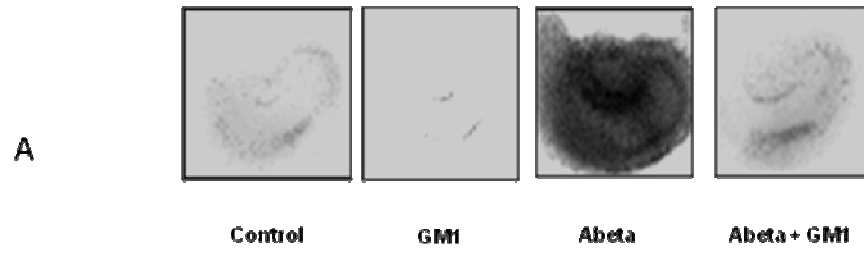
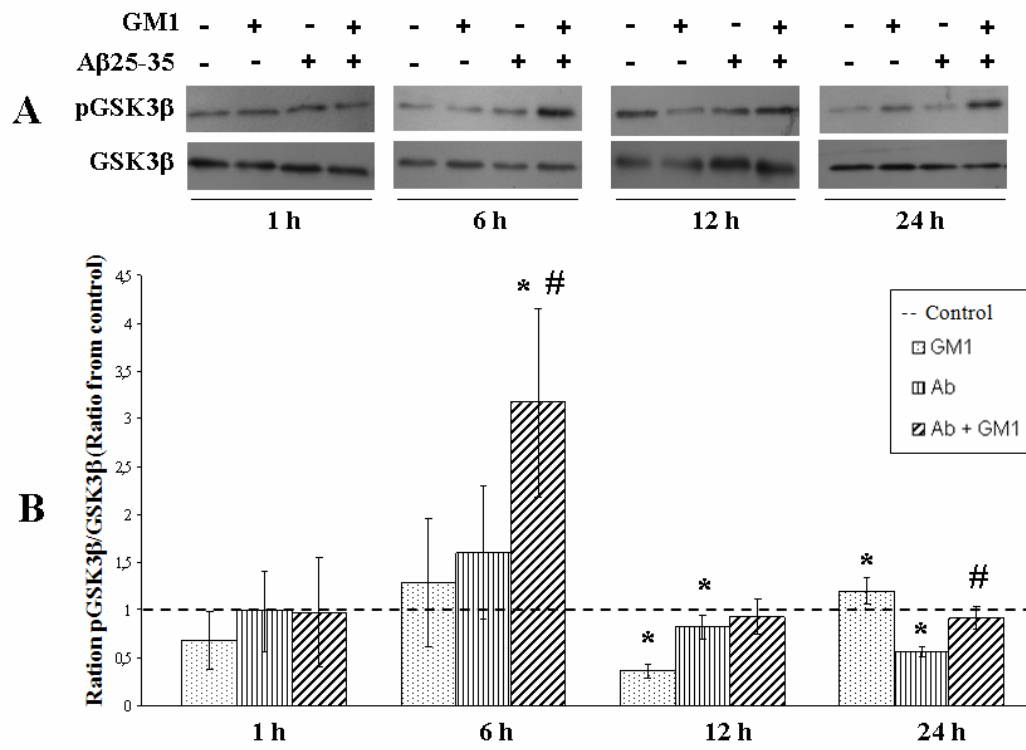


Figure 6



4. DISCUSSÃO

Como apresentado na introdução do presente trabalho, a doença de Alzheimer é uma patologia neurodegenerativa extremamente complexa, cujos mecanismos patofisiológicos ainda não foram completamente esclarecidos. A produção de um peptídeo β -amilóide a partir de um processamento anormal da Proteína Precursora Amilóide (APP), seguida dos processos de oligomerização e/ou fibrilação deste peptídeo, são eventos que desempenham papel chave no desenvolvimento e na progressão dessa patologia. Apesar de não serem os únicos fenômenos bioquímicos detectados na DA, são considerados os responsáveis por boa parte dos efeitos neurotóxicos nela observados (Suh and Checler, 2002).

Embora por muito tempo, apenas à forma fibrilada do β -amilóide fosse atribuída uma função neurotóxica, estudos recentes indicam que formas intermediárias de agregação do peptídeo, as quais, apesar de serem solúveis e não propensas a depositar-se no parênquima cerebral, poderiam ter importante participação nos danos neurais desencadeados pela cascata amilóide. Desta forma, torna-se necessário analisar não apenas os efeitos bioquímicos/celulares deflagrados pelo peptídeo fibrilado, mas também, avaliar a capacidade de formas solúveis deste peptídeo induzirem alterações celulares importantes (Walsh and Selkoe, 2007).

Os peptídeos β -amilóides produzidos, naturalmente, pelo metabolismo da APP, são constituídos de 39 a 43 resíduos de aminoácidos. Dentre estes, aquele composto por 42 aminoácidos, A β 1-42, tem maior propensão a fibrilar *in vivo* e, conseqüentemente levar a formação das placas senis. No entanto, uma série de estudos tem analisado a possibilidade e viabilidade de se utilizar análogos sintéticos do peptídeo β -amilóide em modelos de DA. Um destes análogos é o peptídeo β -amilóide composto pela seqüência dos aminoácidos 25-35 do peptídeo natural, então chamado A β 25-35. Este análogo desencadeia mecanismos de toxicidade muito semelhantes ao peptídeo natural (El Khoury et al., 1996; Yan et al., 1996; Guan et al., 2001; Qi et al., 2005; Frozza et al., 2009), e, a exemplo deste, apresenta uma alta capacidade de fibrilação *in vitro* (Kowall et al., 1992). Desta forma, por razões práticas e econômicas, a utilização do A β 25-35 torna-se uma alternativa conveniente e viável para o estudo da toxicidade ou das alterações bioquímico-celulares desencadeadas pelo β -amilóide.

Em termos de modelo experimental, as culturas organotípicas apresentam uma série de vantagens frente a modelos de cultura celular ou a modelos *in vivo* para o estudo de toxicidade ou de neuroproteção, bem como, para a análise das alterações bioquímicas envolvidas nestes processos. A exemplo das culturas celulares, e ao contrário do que se tem em modelos *in vivo*, as culturas organotípicas permitem um maior controle sobre parâmetros bioquímicos e/ou fisiológicos como temperatura, oxigenação, disponibilidade de nutrientes ou mesmo de drogas, eventualmente, em estudo. Além disto, as culturas organotípicas permitem uma manutenção da arquitetura tecidual e das interações/conexões celulares, bem como possibilitam a manutenção do desenvolvimento das fatias de tecido mantidas em cultura. Desta forma, para o estudo de alterações bioquímicas que acompanham a DA, bem como, para o estudo de possíveis mecanismos de neuroproteção para esta patologia, modelos de cultura organotípica de fatias hipocampo (principal estrutura cerebral afetada em pacientes com a DA) representam uma boa alternativa comparada aos modelos *in vivo* e aos modelos de cultura celular (Stoppini et al., 1991; Tavares et al., 2001; Cimarosti et al., 2005; Holopainen, 2005; Horn et al., 2005).

Neste modelo, fatias de 400 micrômetros são obtidas a partir de ratos com idade entre 6 e 8 dias de vida pós-natal. Embora a DA acometa indivíduos já senis, é necessário a utilização de animais com esta idade para a obtenção das culturas, visto que fatias de hipocampo de animais com maior idade não apresentariam a mesma plasticidade e conseqüentemente, não se manteriam viáveis em cultura. A fim de contornar este problema, as culturas são mantidas por um período de 30 dias, o qual é suficiente para uma adequada maturação do tecido, na tentativa de mimetizar o estágio de desenvolvimento de uma fatia de tecido que, eventualmente, fosse obtida a partir de um animal adulto (Stoppini et al., 1991; Tavares et al., 2001).

Neste sentido, e considerando os dados da literatura que sugerem uma participação dos gangliosídios e da dinâmica das membranas neurais, no desenvolvimento ou no desfecho da DA, o presente trabalho analisou o efeito do peptídeo A β 25-35, em sua forma fibrilada e não-fibrilada, sobre a biossíntese dos gangliosídios em fatias de hipocampo mantidas em cultura organotípica.

A marcação metabólica dos gangliosídios foi realizada por meio da incubação das fatias hipocampais com D-[1-C¹⁴] galactose, a qual, após adentrar as células é convertida a UDP-[1-C¹⁴] galactose, e então incorporada na via de biossíntese dos gangliosídios ou dos demais glicolipídios e glicoproteínas. A posterior extração lipídica

com solvente orgânico, seguida de purificação em sílica G25 e da separação cromatográfica das espécies lipídicas radiomarcadas, possibilitou analisar especificamente o efeito dos peptídeos (fibrilado e não fibrilado) sobre o perfil das diferentes espécies de gangliosídios.

Como resultado, observamos que o peptídeo A β 25-35 foi capaz de promover uma alteração na biossíntese dos gangliosídios, sendo este efeito dependente de seu estado de fibrilação. Desta forma, o peptídeo fibrilado foi capaz de aumentar significativamente a biossíntese de GM3 e reduzir a de GD1b, ao passo que o A β 25-35 não submetido ao processo de fibrilação *in vitro* promoveu um aumento na biossíntese do gangliosídeo GM1 ($p < 0.05$) (Figura 4).

O mecanismo que leva o peptídeo A β 25-35 a afetar a biossíntese dos gangliosídios de forma diferencial, conforme seu estado de fibrilação, ainda não é bem compreendido. Sabe-se, no entanto, que o β -amilóide em sua forma não fibrilada seria capaz de adentrar as células (LaFerla et al., 2007) e, conseqüentemente, podemos imaginar que seu efeito intracelular possa ter uma participação importante nos mecanismos de modulação do metabolismo dos gangliosídios. O peptídeo fibrilado, por sua vez, é uma forma de depósito extracelular, não sendo, portanto, captado pelas células. No entanto, ao propiciar a produção de espécies reativas de oxigênio via ativação de NADPH-oxidases de membrana, o peptídeo fibrilado seria capaz de ativar esfingomielinases neutras, residentes na membrana plasmática, enzimas que atuam clivando esfingomielina e liberando ceramida, a qual pode ser desviada para a síntese de gangliosídios (Jana and Pahan, 2004). É preciso ressaltar, no entanto, que estes efeitos são propostos ao peptídeo A β 1-42, não havendo estudos neste sentido para com o peptídeo A β 25-35.

De qualquer forma, as alterações lipídicas propiciadas pelo peptídeo A β 25-35 permitem-nos sugerir que os gangliosídios possam exercer um papel importante nas alterações celulares que acompanham a cascata amilóide.

Uma vez que o GM3 é um gangliosídeo normalmente expresso durante as fases embrionárias do desenvolvimento neural, tendo uma atividade apoptótica quando expresso em células neuronais adultas, um aumento na biossíntese deste gangliosídeo poderia ter uma participação importante nos mecanismos neurotóxicos desencadeados pelo peptídeo em sua forma fibrilada. Os mecanismos pelos quais este gangliosídeo desencadearia um processo de apoptose ainda não foram completamente elucidados,

porém dados da literatura sugerem que o GM3 seria capaz de mediar parte dos efeitos neurotóxicos desencadeados pelo neurotransmissor excitatório glutamato (excitotoxicidade glutamatérgica) (Sohn et al., 2006), bem como gerar ceramida ao ser metabolizado (Valaperta et al., 2006), a qual é um lipídio classicamente associado ao desencadear de processos apoptóticos em células neurais.

O significado de uma redução na biossíntese de GD1b não é muito claro, principalmente em virtude de pouco conhecimento sobre os papéis bioquímicos ou sinalizatórios atribuíveis a esta espécie de gangliosídeo. No entanto, Chen e colaboradores (2005) sugerem uma atividade anti-apoptótica a este gangliosídeo em modelo de cultura de neurônios hipocâmpais. Assim, a diminuição na síntese de GD1b (supostamente anti-apoptótico), aliada a um aumento na de GM3 (apoptótico), pode ter participação nos danos celulares desencadeados pelo A β 25-35.

Por outro lado, o A β 25-35 não submetido à fibrilação *in vitro*, foi capaz de aumentar a biossíntese de GM1 ($p < 0.05$) (Figura 4). O significado deste aumento é ainda controverso, visto que a literatura não chegou a um consenso sobre a real participação deste gangliosídeo nos eventos associados à DA, ora sendo considerado modulador da amiloidogênese e fibrilogênese, (e, portanto, tendo participação no desenvolvimento/progressão da DA), ora sendo associado a processos de neuroproteção.

Desta forma, é sugerido que o GM1 participe dos processos de maturação da proteína precursora amilóide e, ao interagir com esta, através de domínio de ligação a glicoesfingolipídios, possa alterar a distribuição da APP nos diferentes domínios de membrana, o que, como apresentado na introdução deste trabalho, teria importante repercussão no processo de amiloidogênese (Zha et al., 2004; Zhang et al., 2009).

Da mesma maneira, diversos estudos têm demonstrado uma participação do GM1 nos processos de fibrilação do β -amilóide. Este efeito seria devido à capacidade deste gangliosídeo de interagir com o peptídeo, a partir de seu resíduo de ácido siálico, e desta forma induzir uma alteração na conformação do β -amilóide no sentido de acelerar seu processo de agregação e fibrilação. Este efeito, no entanto, tal qual relatado na introdução deste trabalho, é dependente de um *clustering* de diversas moléculas de GM1 em um mesmo *raft* lipídico, sendo, portanto dependente também de alterações no conteúdo ou distribuição de colesterol, bem como da dinâmica dos microdomínios de membrana (Matsuzaki, 2007; Yanagisawa, 2007). Além disso, a capacidade do GM1 de induzir e estabilizar a conformação beta-pregueada do peptídeo β -amilóide é

dependente do pH do meio, bem como de sua força iônica (McLaurin et al., 1998). Este evento foi demonstrado para o A β 1-42, sem relatos do mesmo efeito para seu análogo sintético A β 25-35, alvo do presente estudo. Assim, embora seja tentador propor que o aumento na síntese de GM1, por parte do β -amilóide não fibrilado, represente uma alteração bioquímica no sentido de favorecer uma futura fibrilação deste peptídeo, os dados aqui apresentados são insuficientes para permitir tal conclusão.

Por outro lado, uma série de outros trabalhos tem atribuído ao GM1 um papel neuroprotetor importante, inclusive em modelos de DA. Segundo os dados disponíveis na literatura, o GM1 seria capaz de: mediar a liberação de neurotrofinas, bem como, ativar diretamente os receptores (Trk's) destes fatores neurotróficos (Bachis et al., 2002; Rabin et al., 2002; Mocchetti et al., 2005); ativar diversas vias de sinalização, a exemplo das vias da ERK e da PI3K (Mutoh et al., 1995; Pitto et al., 1998; Duchemin et al., 2002; Lili et al., 2005; Duchemin et al., 2008); exercer efeito antioxidante (Figuera et al., 2004; Furian et al., 2007; Gavella et al., 2007); reduzir a liberação de interleucinas inflamatórias como efeito do peptídeo β -amilóide (Ariga and Yu, 1999); reverter parte dos efeitos tóxicos de neurotransmissores excitatórios como glutamato (excitotoxicidade glutamatérgica) (Cunha et al., 1999); além de restabelecer a síntese de acetilcolina (um neurotransmissor cuja síntese é profundamente afetada ao longo do desenvolvimento da DA) (Fong et al., 1995).

Desta maneira, sugerimos que este aumento na síntese de GM1 poderia representar, a curto prazo, uma forma de adaptação das células/tecido frente a um insulto, não podendo, no entanto, descartar a possibilidade de que, a longo prazo, tal alteração no metabolismo de gangliosídeos venha a favorecer o processo de fibrilação do β -amilóide.

Em virtude disso, realizamos uma série de experimentos com a finalidade de investigar uma possível ação neuroprotetora do GM1 no modelo em estudo. Uma vez que o A β 25-35 foi capaz de promover toxicidade, medida pela captação de iodeto de propídio, apenas quando em sua forma fibrilada (figura 1), optamos por utilizar tão somente o peptídeo fibrilado nos estudos de neuroproteção.

Os experimentos consistiram num pré-tratamento das fatias hipocâmpais com uma solução de GM1, iniciada a partir do 26º dia de cultura, ou seja, 48 horas antes da adição do peptídeo β -amilóide. No 28º *in vitro*, o meio de cultura foi trocado por um meio soro reduzido, e o A β 25-35 fibrilado foi adicionado às culturas juntamente com

mais uma alíquota de GM1. Com 48h de incubação, a morte celular foi analisada por meio da captação de iodeto de propídio. Como resultado, observamos que o GM1, na concentração final de 10 μ M foi capaz de reduzir, significativamente, a morte celular induzida pelo β -amilóide fibrilado (Figura 5). Neste experimento, e por razões ainda não compreendidas, o A β 25-35 apresentou uma toxicidade superior à esperada, fato que se repetiu em diversas culturas subseqüentes. A explicação mais razoável que propomos é a de que o lote de A β 25-35 utilizado nesta bateria de experimentos tenha, por algum motivo, sofrido um processo de fibrilação mais intenso. A concentração de GM1 utilizada neste experimento baseou-se em dados da literatura que sugerem que, nesta concentração, os gangliosídeos seriam capazes de formar micelas em meio aquoso, e desta forma, ter sua incorporação por parte das células aumentada (Rauvala, 1979; Ulrich-Bott and Wiegandt, 1984).

No intuito de corroborar uma possível ação neuroprotetora do GM1 no presente modelo, bem como, avaliar um possível mecanismo sinalizatório pelo qual o GM1 interferiria na toxicidade desencadeada pelo peptídeo A β 25-35, realizamos experimentos para averiguar o efeito do GM1 sobre as alterações induzidas pelo A β 25-35 na via de sinalização celular da GSK3 β .

A via da GSK3 β é uma via de sinalização que está relacionada com desencadeamento de eventos de morte celular programada, neuroinflamação e estresse oxidativo em células neurais. Em modelos de DA a GSK3 β , além de participar dos processos acima citados, desempenha um papel crucial no sentido de mediar a fosforilação da proteína Tau (favorecendo a formação dos emaranhados neurofibrilares), reduzir a síntese de acetilcolina, e como conseqüência, mediar parte dos eventos que levam ao déficit cognitivo. Assim, alguns pesquisadores propõem que esta via desempenhe uma função central no desenvolvimento e nos danos associados à DA (Hooper et al., 2008; Hernández et al., 2009a;b).

A atividade da enzima GSK3 β é regulada por processo de fosforilação e defosforilação. Assim, quando fosforilada, a GSK3 β , que constitutivamente encontra-se ativa, é inativada. Análise de seu estado de fosforilação, portanto, permite-nos avaliar a atividade desta via. Desta forma, alguns trabalhos demonstram que o peptídeo beta-amilóide seria capaz de reduzir a fosforilação da GSK3 β (e conseqüentemente ativar esta via de sinalização), e que este evento traria repercussão sobre a toxicidade desencadeada pelo peptídeo, bem como serviria de mediador entre a formação de placa

senil e dos emaranhados neurofibrilares, como anteriormente discutido. Desta forma, Koh et al. (2008) propõem a análise do estado de fosforilação da GSK3 β como parâmetro ao estudo de drogas neuroprotetoras em modelos de toxicidade do peptídeo beta-amilóide.

A fim de avaliar, portanto, o efeito do GM1 sobre as alterações induzidas pelo A β 25-35 no estado de fosforilação da GSK3 β , realizamos uma série de experimentos em que uma solução 10 μ M deste gangliosídeo foi incubada, concomitantemente ao A β 25-35 fibrilado, e, após 1, 6, 12 ou 24 horas de incubação, o estado de fosforilação da GSK3 β foi analisado por *western-blot* (Figura 6).

Foi possível observar um efeito tempo dependente do GM1 sobre a ativação/inativação da GSK3 β . Com uma hora de incubação, nem o GM1 nem o A β 25-35 foram capazes de afetar o estado de fosforilação da GSK3 β . Com 6 horas de incubação, foi possível verificar que o tratamento com GM1 em conjunto com a incubação do A β 25-35 promoveu um aumento na fração fosforilada (inativa) da enzima. Com 12 horas de incubação, no entanto, o GM1 promoveu uma redução na fosforilação da GSK3 β . Para estes experimentos (1, 6, e 12 horas) o número amostral foi muito pequeno (n=3), de modo que qualquer conclusão neste sentido seria especulativa. Com 24 horas de tratamento, no entanto, nosso número amostral foi suficientemente grande (n=6) para demonstrar que, neste tempo de incubação, o GM1 é capaz de aumentar a fosforilação (inibição) da GSK3 β , e conseqüentemente, reverter o efeito do β -amilóide em ativar esta via de morte celular.

Nossos dados, portanto, sugerem fortemente que o GM1 apresente uma ação neuroprotetora neste modelo. Possivelmente isto seja devido a alterações sinalizatórias que este gangliosídeo desencadeia, não podendo, entretanto, descartar que o efeito neuroprotetor deste gangliosídeo, também possa ser devido a uma ação antioxidante, ou a modulação de outras vias de sinalização celular além da GSK3 β .

Os dados indicando um efeito neuroprotetor ao gangliosídeo GM1, não apenas em modelos de DA, mas também em outros modelos de doenças neurológicas, fazem ressurgir a polêmica questão da utilização deste gangliosídeo na clínica médica. Neste sentido, a utilização clínica de gangliosídios exógenos, em especial o monossialogangliosídeo GM1, tem sido proposta para uma grande diversidade de patologias relacionadas ao sistema nervoso: lesão de medula espinhal (Mahadik and Karpiak, 1988), neuropatias periféricas (Schneider et al., 1994), isquemia (Lazzaro et

al., 1994) e hipóxia (Krajnc et al., 1994). No caso da DA, estudos com infusão intraventricular contínua de GM1 mostrou modesto benefício em pacientes com DA do tipo familiar, os quais tornaram-se mais ativos e apresentaram melhora em funções cognitivas como linguagem e compreensão escrita (Gottfries, 1994; Svennerholm, 1994; Augustinsson et al., 1997; Svennerholm et al., 2002). Além disso, a administração de GM1 em modelos animais evidencia melhora da memória nas mais diversas tarefas (Silva et al., 1996; Fong et al., 1997; Silva et al., 1999; Silv et al., 2000).

Entretanto, o emprego do GM1 na prática clínica é dificultado por duas questões principais: sua baixa biodisponibilidade central e o risco de desencadear doenças auto-imunes.

Devido à presença da barreira hematoencefálica, a biodisponibilidade central do GM1 torna-se extremamente baixa, sendo que apenas cerca de 1 a 3% da dose de GM1 administrada sistemicamente seria capaz de atingir o Sistema Nervoso Central (Orlando et al., 1979; Ghidoni et al., 1989).

Além disso, a administração de gangliosídeos exógenos a pacientes humanos foi relacionada ao desenvolvimento de uma grave síndrome auto-imune, a síndrome de Guillain-Barré, caracterizada por uma polineuropatia motora, normalmente desencadeada por infecções respiratórias ou gastrointestinais, e que envolve a produção de anticorpos anti-gangliosídeos (Kuwabara, 2007). Embora os dados não sejam consistentes para afirmar que a administração de gangliosídeos exógenos seja, por si só, um fator suficiente para o desenvolvimento desta doença auto-imune, desde 1985 foram relatados espontaneamente, na Alemanha, Itália e Espanha, pelo menos 45 casos de pacientes que, após utilizarem produtos contendo gangliosídeos para o tratamento de neuropatia periférica ou outras desordens, vieram a desenvolver a síndrome de Guillain-Barré (Govoni et al., 1997).

No entanto, apesar de todas estas questões, análogos semi-sintéticos de gangliosídeos estão sendo produzidos e testados, os quais apresentam um perfil farmacocinético melhorado e talvez venham a demonstrar uma maior segurança em ensaios clínicos. Desta forma, LIGA20, um análogo semi-sintético do gangliosídeo GM1, já foi testado em modelos experimentais, demonstrando uma atividade neuroprotetora semelhante ou mesmo superior ao do gangliosídeo natural, e apresenta como vantagem, uma maior biodisponibilidade central (Polo et al., 1994; Wells et al., 1996; Wu et al., 2005). Estudos da relação estrutura-atividade de gangliosídeos como GM1, estão ampliando enormemente o desenvolvimento e a descoberta de novos

análogos, de modo que é possível, num futuro próximo, que as atividades neuroprotetoras demonstradas para o GM1 sejam exploradas farmacologicamente através destes compostos (Biraboneye et al., 2009).

5. CONCLUSÕES

Frente aos resultados obtidos no presente trabalho, é possível concluir que:

- O peptídeo beta-amilóide A β 25-35 afeta a biossíntese de gangliosídios de forma dependente a seu estado de fibrilação;

- Em sua forma fibrilada, o A β 25-35 leva a um aumento na biossíntese de GM3 e a uma redução na biossíntese de GD1b, ao passo que em sua forma não fibrilada, este peptídeo proporciona um aumento na biossíntese de GM1.

- O gangliosídeo GM1 apresenta atividade neuroprotetora no presente modelo, atividade esta, possivelmente mediada pelo efeito deste gangliosídeo em reverter a ativação da via da GSK3 β (associada à morte neuronal em modelos de DA) por parte do peptídeo beta-amilóide.

Em resumo, este trabalho vem a reforçar as evidências da participação dos gangliosídios em modelos da doença de Alzheimer, e dá suporte ao estudo neuroprotetor do gangliosídeo GM1, ou futuramente, de seus análogos biossintéticos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Achyuthan, K.E., Achyuthan, A.M., 2001. Comparative enzymology, biochemistry and pathophysiology of human exo-alpha-sialidases (neuraminidases). *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry and Molecular Biology* 129, (1), 29-64.
- Alcorn, A. L., 2007. Lipid rafts observed in cell membranes. *Science & Technology Review*, Disponível em <http://www.llnl.gov/str/may07/ratto.html>
- Andrade, C.M.B., Trindade, V.M.T., Cardoso, C.C.A., Ziulkoski, A.L., Trugo, L.C., Guaragna, R.M., Borojevic, R., Guma, F.C.R., 2003. Changes of sphingolipid species in the phenotypeconversion from myofibrilblasts to lipocytes in hepaticstellate cells. *J. Cell. Biochem.* 88, 533-544
- Ariga, T., Yu, R.K., 1999. GM1 Inhibits Amyloid Protein-Induced Cytokine Release. *Neurochemical Research*, 24(2), 219-226
- Ariga, T., McDonald, M.P., Yu, R.K., 2008. Role of ganglioside metabolism in the pathogenesis of Alzheimer's disease--a review. *Journal of Lipid Research.* 49(6), 1157-117.
- Augustinsson, L. E., K., Blennow, C., Blomstrand, G., Brane, R., Ekman, P., Fredman, I., Karlsson, M., Kihlgren, W., Lehmann, A., Lekman, 1997. Intracerebroventricular administration of GM1 ganglioside to presenile Alzheimer patients. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders* 8, 26–33.
- Bachis, A., Rabin, S.J., Fiacco, M., Mocchetti, I., 2002. Gangliosides Prevent Excitotoxicity Through Activation of TrkB Receptor. *Neurotoxicity Research*, 4 (3), 225-234.
- Barrier, L., Ingrand, S., Damjanac, M., Bilan, A.R., Hugon, J., Page, G., 2007. Genotype-related changes of ganglioside composition in brain regions of transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging* 28, 1863–1872.
- Biraboneye, A.C., Madonna, S., Laras, Y., Krantic, S., Maher, P., Kraus, J.L., 2009. Potential Neuroprotective Drugs in Cerebral Ischemia: New Saturated and Polyunsaturated Lipids Coupled to Hydrophilic Moieties: Synthesis and Biological Activity. *Journal of Medicinal Chemistry*. DOI:10.1021/jm900227u
- Blurton-Jones, M., Laferla, F.M., 2006. Pathways by which Abeta facilitates tau pathology. *Current Alzheimer Research* (3) 5, 437-448.

- Casal, C., Serratos, J., Tussel, J.M., 2004. Effects of β -AP peptides on activation of the transcription factor NF-kappaB and in cell proliferation in glial cell cultures. *Neuroscience Research* 24, 233-238
- Chauhan, N.B., 2003. Membrane dynamics, cholesterol homeostasis, and Alzheimer's disease. Thematic Review. *Journal of Lipid Research* 44, 2019-2029.
- Chen, X., Chi, S., Liu, M., Yang, W., Wei, T., Qi, Z., Yang, F., 2005. Inhibitory effect of ganglioside GD1b on K⁺ current in hippocampal neurons and its involvement in apoptosis suppression. *Journal of Lipid Research* 46(12),2580-2585.
- Cheng, H., Vetrivel, K.S., Gong, P., Meckler, X., Parent, A., Thinakaran, G., 2007. Mechanisms of Disease: new therapeutic strategies for Alzheimer's disease - targeting APP processing in lipid rafts (Review). *Nature Clinical Practice Neurology*. 3 (7), 374-382.
- Cimarosti, H., Zamin, L.L., Frozza, R., Nassif, M., Horn, A.P., Tavares, A., Netto, C.A., Salbego, C., 2005. Estradiol protects against oxygen and glucose deprivation in rat hippocampal organotypic cultures and activates Akt and inactivates GSK-3 β . *Neurochemical Research* 30, 191-199.
- Cotran, R.S., Kumar, V., Robbins, S.L., 1994. Pathologic Basis of Disease. In: Girolami, de U.; Frosch, M.P.; Anthony, D.C. The Central Nervous system. 5. Ed. Philadelphia: W.B. Saunders.
- Cunha, G.M., Moraes, R.A., Moraes, G.A., França, M.C. Jr, Moraes, M.O., Viana, G.S., 1999. Nerve growth factor, ganglioside and vitamin E reverse glutamate cytotoxicity in hippocampal cells. *European Journal of Pharmacology* 367(1), 107-112.
- d'Azzo, A., Tessitore, A., Sano, R., 2006. Gangliosides as apoptotic signals in ER stress response (Review). *Cell Death and Differentiation*. 13(3), 404-414.
- DaSilva, K.A., Shaw, J.E., McLaurin, J., 2009. Amyloid- β fibrillogenesis: Structural insight and therapeutic intervention. *Experimental Neurology*. *in Press* . doi:10.1016/j.expneurol.2009.08.032
- Drechsel, D.N., Hyman, A.A., Cobb, M.H., Kirschner, M.W, 1992. Modulation of the dynamic instability of tubulin assembly by microtubule-associated protein tau. *Molecular and Cellular Biology* (3) 10, 1141-1154.

- Duchemin, A.M., Qun, R., Lili, M., Norton, H.N, Hadjiconstantinou, M., 2002. GM1 ganglioside induces phosphorylation and activation of Trk and Erk in brain. *Journal of Neurochemistry* 81, 696–707.
- Duchemin, A.M., Qun, R., Norton, H.N, Hadjiconstantinou, M., 2008. GM1-induced activation of phosphatidylinositol 3-kinase: involvement of Trk receptors. *Journal of Neurochemistry* 104, 1466-1477.
- Ehehalt, R., Keller, P., Haass, C., Thiele, C., Simons, K., 2003. Amyloidogenic processing of the Alzheimer amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *The Journal of Cell Biology*. 160(1), 113–123
- El Khoury, J., Hickman, S.E., Thomas, C.A., Cao, L., Silverstein, S.C., Loike, J.D., 1996. Scavenger receptor-mediated adhesion of microglia to beta amyloid fibrils. *Nature* 382, 716–719.
- Fantini, J., Barrantes, F.J, 2009. Sphingolipid/cholesterol regulation of neurotransmitter receptor conformation and function. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1788(11), 2345-2361.
- Figuera, M.R., Bonini, J.S., Frussa-Filho, R., Dutra-Filho, C.S., Hagen, M.E., Rubin, M.A., Mello, C.F., 2004. Monosialoganglioside increases catalase activity in cerebral cortex of rats. *Free Radical Research*. 38(5), 495-500.
- Fong, T.G., Neff, N.H., Hadjiconstantinou, M., 1995. Systemic Administration of GM1 Ganglioside Increases Choline Acetyltransferase Activity in the Brain of Aged Rats. *Experimental Neurology* 132, 157-161.
- Fong, T.G., Neff, N.H., Hadjiconstantinou, M., 1997. GM1 ganglioside improves spatial learning and memory of aged rats. *Behavior Brain Research* 85, 203-211.
- Freire, E., Gomes, F.C., Jotha-Mattos, T., Neto, V.M., Silva Filho, F.C., Coelho-Sampaio, T., 2004. Sialic acid residues on astrocytes regulate neuritogenesis by controlling the assembly of laminin matrices. *Journal Cell Science*. 117(18), 4067-4076.
- Frezza, R.L., Horn, A.P., Hoppe, J.B., Simão, F., Gerhardt, D., Comiran, R.A., Salbego, C.G., 2009. A Comparative Study of β -Amyloid Peptides A β 1-42 and A β 25-35 Toxicity in Organotypic Hippocampal Slice Cultures. *Neurochemical Research* 34, 295–303.
- Furian, A.F., Oliveira, M.S., Royes, L.F., Fiorenza, N.G., Figuera, M.R., Myskiw, J.C., Weiblen, R., Rubin, M.A., Frussa-Filho, R., Mello, C.F., 2007. GM1 ganglioside

- induces vasodilation and increases catalase content in the brain. *Free Radical Biology and Medicine* 43(6), 924-932.
- Garcia-Ruiz, C., Colell, A., Paris, R., Fernández-Checa, J.C., 2000. Direct interaction of GD3 ganglioside with mitochondria generates reactive oxygen species followed by mitochondrial permeability transition, cytochrome c release, and caspase activation. *FASEB Journal*. 14, 847–858
- Garofalo, T., Tinari, A., Matarrese, P., Giammarioli, A.M., Manganelli, V., Ciarlo, L., Misasi, R., Sorice, M., Malorni, W., 2007. Do mitochondria act as "cargo boats" in the journey of GD3 to the nucleus during apoptosis? *FEBS Letters*. 581(21), 3899-3903.
- Gavella, M., Kveder, M., Lipovac, V., Jurasin, D., Filipovi-Vincekovic, N., 2007. Antioxidant properties of ganglioside micelles. *Free Radical Research*. 41(10), 1143-1150.
- Ghidoni, R., Fiorilli, A., Trinchera, M., Venerando, B., Chigorno, V., Tettamanti, G., 1989. Uptake, cell penetration and metabolic processing of exogenously administered GM1 ganglioside in rat brain. *Neurochemistry International* 15, 455-465.
- Golde, T.E., 2006. Disease modifying therapy for AD? *Journal of Neurochemistry*. (99) 3, 689-707.
- Gottfries, C. G., 1994. Therapy options in Alzheimer's disease. *British Journal of Clinical Practice*. 48, 327–330.
- Govoni, V., Granieri, E., Tola, M.R., Paolino, E., Casetta, I., Fainardi, E., Monetti, V.C., 1997. Exogenous gangliosides and Guillain-Barré syndrome. An observational study in the local health district of Ferrara, Italy. *Brain* 120(7), 1123-1130.
- Graeber, M.B., Kösel, S., Grasbon-Frodl, E., Möller, H.J., Mehraein, P., 1998. Histopathology and APOE genotype of the first Alzheimer disease patient, Auguste D. *Neurogenetics*. 1(3), 223-228.
- Guan, Z.Z., Miao, H., Tian, J.Y., Unger, C., Nordberg, A., Zhang, X., 2001. Suppressed expression of nicotinic acetylcholine receptors by nano molar beta-amyloid peptides in PC12 cells. *Journal of Neural Transmission* 108, 1417–1433.
- Haass, C., Selkoe, D. J., 2007. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid β -peptide. *Nature Reviews/ Molecular Cell Biology* 8, 101-112.

- Hernández, F., Avila, J., 2007. Tauopathies. *Cellular and Molecular Life Sciences* 64, 2219 – 2233.
- Hernández, F., de Barreda, E.G., Fuster-Matanzo, A., Goñi-Oliver, P., Lucas, J.J., Avila, J., 2009a. The role of GSK3 in Alzheimer disease. *Brain Research Bulletin* 80, 248–250.
- Hernández, F., Barreda, E.G., Fuster-Matanzo, A., Lucas, J.J., Avila, J., 2009b. GSK3: A possible link between beta amyloid peptide and tau protein. *Experimental Neurology*. Article in Press. doi:10.1016/j.expneurol.2009.09.011
- Holopainen, I.E, 2005. Organotypic hippocampal slice cultures: a model system to study basic cellular and molecular mechanisms of neuronal cell death, neuroprotection, and synaptic plasticity. *Neurochemical Research* 30, 1521–1528.
- Hooper, C., Killick, R., Lovestone, S., 2008. The GSK3 hypothesis of Alzheimer's disease (Minireview). *Journal of Neurochemistry* 104, 1433–1439.
- Horn, A.P., Gerhardt, D., Geyer, A.B., Valentim, L., Cimarosti, H., Tavares, A., Horn, F., Lenz, G., Salbego, C., 2005. Cellular death in hippocampus in response to PI3-K pathway inhibition and oxygen and glucose deprivation. *Neurochemical Research* 30, 355–361.
- Ichikawa, N., Iwabuchi, K., Kurihara, H., Ishii, K., Kobayashi, T., Sasaki, T., Hattori, N.; Mizuno, Y., Hozumi, K., Yamada, Y., Arikawa-Hirasawa, E., 2009. Binding of laminin-1 to monosialoganglioside GM1 in lipid rafts is crucial for neurite outgrowth. *Journal of Cell Science* 122(2), 2892-2899.
- Iqbal, K., Alonso, A.C, Chen, S., Chohan, M.O., El-Akkad, E., Gong, C., Khatoon, S., Li, B., Liu, F., Rahman, A., Tanimukai, H., Iqbal, I. G., 2005. Tau Pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. *Biochimica et Biophysica Acta* 1739, 198-210.
- Jana, A., Pahan, K., 2004. Fibrillar Amyloid- β Peptides Kill Human Primary Neurons via NADPH Oxidase-mediated Activation of Neutral Sphingomyelinase. *The Journal of Biological Chemistry* 279(49), 51451-51459.
- Jia-Qi, S., Ming, W., Da-Miao, Z., Li-Guang, S., Di-Yun, R., 2005. Effect of ganglioside on synaptic plasticity of hippocampus in lead-exposed rats in vivo. *Brain Research* 1060(1-2), 162-169.
- Koh, S.H., Noh, M.Y., Kim, S.H., 2008. Amyloid-beta-induced neurotoxicity is reduced by inhibition of glycogen synthase kinase-3. *Brain Research* 1188, 254 – 262.

- Kowall, N.W., McKee, A.C., Yankner, B.A., Beal, M.F., 1992. In vivo neurotoxicity of beta-amyloid [beta(1–40)] and the beta(25–35) fragment. *Neurobiology of Aging* 13 (5), 537–542.
- Krajnc, D., Wemlinger, T.A., Neff, N.H., Hadjiconstantinou, M., 1994. Neonatal hypoxia: early neurotransmitter responses and the consequences of treatment with GM1 ganglioside. *Journal Pharmacology Experimental Therapeutics* 271: 1299–1305.
- Kristal, B.S., Brown, A.M., 1999. Apoptogenic Ganglioside GD3 Directly Induces the Mitochondrial Permeability Transition. *The Journal of Biological Chemistry* 274(33), 23169–23175
- Kuwabara, S., 2007. Guillain-Barré syndrome. *Current Neurology and Neuroscience Reports* 7, 57-62.
- LaFerla, F.M., Green, K.N., Oddo, S., 2007. Intracellular amyloid- β in Alzheimer's disease. *Nature Reviews | Neuroscience* 8, 499-509.
- Lake, B.D., Goodwin, H.J., 1976. Lipids. In: Smith I, Seakins JWT, editors. *Chromatographic and eletrophoretic*. London;WilliamHeinemannMedicalBooks Ltd. 345–366
- Lazzaro, A., Seren, M.S., Koga, T., Zaroni, T., Schiavo, N., Manev, H., 1994. GM1 reduces infarct volume after focal cerebral ischemia. *Experimental Neurology* 125, 278-285.
- Ledeen, R.W., Wu, G., 2006a. GM1 ganglioside: another nuclear lipid that modulates nuclear calcium. GM1 potentiates the nuclear sodium-calcium exchanger. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 84(3-4), 393-402.
- Ledeen, R.W., Wu, G., 2006b. Gangliosides of the nuclear membrane: a crucial locus of cytoprotective modulation. *Journal of Cellular Biochemistry* 97(5), 893-903.
- Lili, M., Qun, R., Duchemin, A.M., Neff, N.H., Hadjiconstantinou, M., 2005. GM1 and ERK signaling in the aged brain. *Brain Research* 1054, 125 – 134.
- Lopez, P.H.H., Schnaar, R.L., 2009. Gangliosides in cell recognition and membrane protein regulation. *Current Opinion in Structural Biology* 19(5), 549-557.
- Maccioni, H.J.F., Daniotti, J.L., Martina, J.A. 1999. Organization of gangliosides synthesis in the Golgi apparatus. *Biochimica et Biophysica Acta* 1437:101–118.
- Maccioni, H.J.F., Giraud, C.G., Daniotti, J.L., 2002. Understanding the Stepwise Synthesis of Glycolipids. *Neurochemical Research* 27, 629-636.

- Macklis, J.D., Madison, R.D., 1990. Progressive incorporation of propidium iodide in cultured mouse neurons correlates with declining electrophysiological status: a fluorescence scale of membrane integrity. *Journal of Neuroscience Method* 31, 43–46.
- Mahadik, S.P., and Karpiak, S.E., 1988. Gangliosides in treatment of neural injury and disease. *Drug Development Research* 15, 337-336
- Markesbery, W.R., 1997. Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Radical Biological Medicine* 23, 134-147.
- Matsuzaki, K., 2007. Physicochemical interactions of amyloid β -peptide with lipid bilayers (Review). *Biochimica et Biophysica Acta*. 1768(8), 1935-1942.
- Mattson, M.P., Chan, S.L., 2001. Dysregulation of cellular calcium homeostasis in Alzheimer's disease: bad genes and bad habits. *Journal of Molecular Neurosciences* 17, 205-224.
- McLaurin, J., Franklin, T., Fraser, P.E., Chakrabartty, A., 1998. Structural transitions associated with the interaction of Alzheimer β -amyloid peptides with gangliosides. *Journal of Biological Chemistry* 273, 4506-4515.
- Mendez-Otero, R., Santiago, M.F., 2001. Functional role of a glycolipid in directional movements of neurons. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 73 (2), 221-229.
- Miyagi, T., Wada, T., Yamaguchi, K., 2008a. Roles of plasma membrane-associated sialidase NEU3 in human cancers. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1780(3), 532-537.
- Miyagi, T., Wada, T., Yamaguchi, K., Hata, K., Shiozaki, K., 2008b. Plasma membrane-associated sialidase as a crucial regulator of transmembrane signalling. *Journal of Biochemistry* 144(3), 279-285.
- Mocchetti, I., 2005. Exogenous gangliosides, neuronal plasticity and repair, and the neurotrophins (Review). *Cellular and Molecular Life Sciences*. 62, 2283-2294.
- Monji, A., Utsumi, H., Ueda, T., Imoto, T., Yoshida, I., Hashioka, S., Tashiro, K., Tashiro, N., 2001. The relationship between the aggregational state of the amyloid-beta peptides and free radical generation by the peptides. *Journal of Neurochemistry* 77, 1425-1432.
- Montagut, C., Rovira, A., Albanell, J., 2006. The proteasome: a novel target for anticancer therapy. *Clinical and Translational Oncology*. (8) 5, 313-317.

- Mutoh, T., Tokuda, A., Miyadai, T., Hamaguchi, M., Fujiki, N., 1995. Ganglioside GM1 binds to the Trk protein and regulates receptor function. *Cell Biology* 92, 5087-5091.
- Nassif M., Hoppe, J., Santin, K., Frozza, R., Zamin, L.L., Simão, F., Horn, A.P., Salbego, C., 2007. Beta-amyloid peptide toxicity in organotypic hippocampal slice culture involves Akt/PKB, GSK-3beta, and PTEN. *Neurochemistry International*. 50 (1), 229-35.
- Negreiros, E.M., Leão, A.C., Santiago, M.F., Mendez-Otero, R., 2003. Localization of ganglioside 9-O-acetyl GD3 in point contacts of neuronal growth cones. *Journal of Neurobiology* 57(1), 31-37.
- Noraberg, J., Kristensen, B.W., Zimmer, J., 1999. Markers for neuronal degeneration in organotypic slice cultures. *Brain Research Protocols* 3(3), 278-290.
- Nores, G.A., Mitzumari, R.K., Kremer, D.M., 1994. Chromatographic tank designed to obtain highly reproducible highperformance thin-layer chromatograms of gangliosides and neutral glycosphingolipids. *Journal of Chromatography* 686, 155–157.
- Orlando, P., Cocciantè, G., Ippolito, G., Massari, P., Roberti, S., Tettamanti, G., 1979. The fate of tritium labeled GM1 ganglioside injected in mice. *Pharmacology Research Communications* 11, 759-773.
- Peterson, G.L., 1977. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry* 83(2), 346-356.
- Pimplikar, S.W., 2009. Reassessing the amyloid cascade hypothesis of Alzheimer's disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 41, 1261–1268.
- Pitto, M., Mutoh, T., Kuriyama, M., Ferraretto, A., Palestini, P., Masserini, M., 1998. Influence of endogenous GM1 ganglioside on TrkB activity, in cultured neurons. *FEBS Letters* 439, 93-96.
- Polo, A., Kirschner, G., Guidotti, A., Costa, E., 1994. Brain content of glycosphingolipids after oral administration of monosialogangliosides GM1 and LIGA20 to rats. *Molecular and Chemical Neuropathology* 21, 41-53.
- Prokazova, N. V., Samovilova, N. N., Gracheva, E. V., Golovanova, N. K., 2009. Ganglioside GM3 and Its Biological Functions. *Biochemie (Moscow)* 74(3), 235-249.
- Qi, X.L., Xiu, J., Shan, K.R., Xiao, Y., Gu, R., Liu, R.Y., Guan, Z.Z., 2005. Oxidative stress induced by beta-amyloid peptide (1–42) is involved in the altered

- composition of cellular membrane lipids and the decreased expression of nicotinic receptors in human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Neurochemistry International* 46 (8), 613–621.
- Rabin, S.J., Bachis, A., Mocchetti, I., 2002. Gangliosides Activate Trk Receptors by Inducing the Release of Neurotrophins. *The Journal of Biological Chemistry* 277(51), 49466-49472.
- Rahmann, H., 1995. Brain gangliosides and memory formation. *Behavior Brain Research* 66(1-2), 105-116.
- Ramirez, M.R., Muraro, F., Zylbersztejn, D.S., Abel, C.R., Arteni, N.S., Lavinsky, D., Netto, C.A., Trindade, V.M., 2003. Neonatal hypoxia-ischemia reduces ganglioside, phospholipid and cholesterol contents in the rat hippocampus. *Neuroscience Research* 46(3), 339-347.
- Rapoport, M., Ferreira, A., 2000. PD98059 prevents neurite degeneration induced by fibrillar beta-amyloid in mature hippocampal neurons. *Journal of Neurochemistry* 74, 125-133.
- Rauvala, H., 1979. Monomer-micelle transition of the ganglioside GM1 and the hydrolysis by *Clostridium perfringens* neuraminidase. *European Journal Biochemistry* 97, 555-564.
- Reid, P.C., Urano, Y., Kodama, T., Hamakubo, T., 2007. Alzheimer's Disease: cholesterol, membrane rafts, isoprenoids and statins (Review). *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 11(3), 383-392.
- Rosales-Fritz, V.M., Daniotti, J.L., Maccioni, H.J.F., 1997. Chinese hamster ovary cells lacking - GM1 and GD1a synthesize gangliosides upon transfection with human GM2 synthase. *Biochimica Biophysica Acta* 1354, 153–158.
- Schneider, J.S., Smith, M.G., DiStefano, L., Berrian, J., 1994. GM1 ganglioside treatment partially reverses the nigrostriatal dopamine defect in the weaver mutant mouse. *Brain Research* 636, 353-356.
- Silv, R.H., Bergamo, M., Frussa-Filho, R., 2000. Effects of neonatal ganglioside GM1 administration on memory in adult and old rats. *Pharmacology & Toxicology* 87, 120-125.
- Silva, R.H., Felicio, L.F., Frussa-Filho, R., 1999. Ganglioside GM1 attenuates scopolamine-induced amnesia in rats and mice. *Psychopharmacology (Berl)* 141, 111-117.

- Silva, R.H., Felicio, L.F., Nasello, A.G., Vital, M.A., Frussa-Filho, R., 1996. Effect of ganglioside (GM1) on memory in senescent rats. *Neurobiology of Aging* 17, 583-586.
- Simons, K., Ehehalt, R., 2002. Cholesterol, lipid rafts, and disease. *Journal of Clinical Investigation*.110, 597-603.
- Simons, K., Ikonen, E., 1997.. Functional rafts in cell membranes. *Nature*. 387, 569-572.
- Sohn, H., Kim, Y.S., Kim, H.T., Kim, C.H., Cho, E.W., Kang, H.Y., Kim, N.S., Kim, C.H., Ryu, S.E., Lee, J.H., Ko, J.H., 2006. Ganglioside GM3 is involved in neuronal cell death. *FASEB Journal*. 20(8), 1248-1250.
- Sokolova, T.V., Zakharova, I.O., Furaev, V.V., Rychkova, M.P., Avrova, N.F., 2007. Neuroprotective effect of ganglioside GM1 on the cytotoxic action of hydrogen peroxide and amyloid beta-peptide in PC12 cells. *Neurochemical Research* 32(8), 1302-13.
- Stefanello, F.M., Kreutz, F., Scherer, E.B.S., Breier, A.C., Vianna, L.P., Trindade, V.M.T., Wyse, A.T.S., 2007. Reduction of gangliosides, phospholipids and cholesterol content in cerebral cortex of rats caused by chronic hypermethioninemia. *International Journal of Developmental Neuroscience* 25(7), 473-477.
- Stoppini, L., Buchs, P.A., Muller, D., 1991. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *Journal of Neurosciences Methods* 37, 173–182.
- Suh, Y., Checler, F., 2002. Amyloid Precursor Protein, Presenilins, and α -Synuclein: Molecular Pathogenesis and Pharmacological Applications in Alzheimer's Disease (Review). *Pharmacological Review*. 54, 469-525.
- Svennerholm, L., 1957. Quantitative estimation of sialic acids a colorimetric resorcinol-hydrochloric acid method. *Biochim Biophys Acta* 24, 604–611.
- Svennerholm, L., 1963. Isolation of gangliosides. *Acta Chemica Scandinavica* 17:239-250.
- Svennerholm, L., 1980. Gangliosides and synaptic transmission. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 125, 533-544.
- Svennerholm, L., 1994. Gangliosides—a new therapeutic agent against stroke and Alzheimer's disease. *Life Sciences*. 55, 2125–2134.

- Svennerholm, L., Brane, G., Darlsson, I., Leckman, A., Ramstrom, I., Wikkelso, C., 2002. Alzheimer disease- effect of continuous intracerebroventricular treatment with GM1 ganglioside and a systematic activation programme. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders* 14, 128-136.
- Svennerholm, L., Gottfries, C., 1994. Membrane lipids, selectively diminished in Alzheimer brains, suggest synapse loss as a primary event in early-onset form (type I) and demyelination in late-onset form (type II). *Journal of Neurochemistry* 62, 1039-1047.
- Tamboli, I.Y., Prager, K., Barth, E., Heneka, M., Sandhoff, K., Walter, J., 2005. Inhibition of Glycosphingolipid Biosynthesis Reduces Secretion of the b-Amyloid Precursor Protein and b-Amyloid-Peptid. *The Journal of Biological Chemistry* (288) 30, 28110-28117.
- Tavares, A., Cimarosti, H., Valentim, L., Salbego, C., 2001. Profile of phosphoprotein labelling in organotypic slice cultures of rat hippocampus. *Neuroreport* 12, 2705–2709.
- Tempera, I., Buchetti, B., Lococo, E., Gradini, R., Mastronardi, A., Mascellino, M.T., Sale, P., Mosca, L., d'Erme, M., Lenti, L., 2008. GD3 nuclear localization after apoptosis induction in HUT-78 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*.368(3), 495-500.
- Tettamanti, G., 2004. Ganglioside/glycosphingolipid turnover: New concepts. *Glycoconjugate Journal* 20, 301–317.
- Trindade, V.M., Daniotti, J.L., Raimondi, L., Chazan, R., Netto, C.A., Maccioni, H.J., 2001. Effects of neonatal hypoxia/ischemia on ganglioside expression in the rat hippocampus. *Neurochemical Research* 26(6),591-597.
- Trindade, V.M.T., Brusque, A.M., Raasch, J.R., Pettenuzzo, L.F., Rocha, H.P., Wannmacher, C.M.D., Wajner, M., 2002. Ganglioside Alterations in the Central Nervous System of Rats Chronically Injected with Methylmalonic and Propionic Acids. *Metabolic Brain Disease* 17(2), 93-102.
- Ulrich-Bott, B., Wiegandt, H., 1984. Micelle properties of glycosphingolipids in aqueous media. *Journal of Lipid Research*. 25, 1233-1245.
- Valaperta, R., Chigorno, V., Basso, L., Prinetti, A., Bresciani, R., Preti, A., Miyagi, T., Sonnino, S., 2006. Plasma membrane production of ceramide from ganglioside GM3 in human fibroblasts. *FASEB Journal*. 20(8), 1227-122.

- Valentim, L.M., Rodnight, R., Geyer, A.B., Horn, A.P., Tavares, A., Cimarosti, H., Netto, C.A., Salbego, C.G., 2003. Changes in heat shock protein 27 phosphorylation and immunocontent in response to preconditioning to oxygen and glucose deprivation in organotypic hippocampal cultures. *Neuroscience* 118, 379–386
- Vianna, L.P., Delwing, D., Kurek, A.G., Breier, A.C., Kreutz, F., Chiarani, F., Stefanello, F.M., Wyse, A.T., Trindade, V.M., 2008. Effects of chronic proline administration on lipid contents of rat brain. *International Journal of Developmental Neurosciences* 26(6), 567-573.
- Vyas, A.A, Schnaar, R.L., 2001. Brain gangliosides: Functional ligands for myelin stability and the control of nerve regeneration. *Biochimie* 83, 677-682.
- Wahrle, S., Das, P., Nyborg, A.C., McLendon, C., Shoji, M., Kawarabayashi, T., Younkin, L.H., Younkin, S.G., Golde, T.E., 2002. Cholesterol-Dependent γ -Secretase Activity in Buoyant Cholesterol-Rich Membrane Microdomains. *Neurobiology of Disease* 9, 11–23.
- Walsh, D.M., Selkoe, D.J., 2007. A β Oligomers – a decade of discovery. *Journal of Neurochemistry*, 101, 1172–1184.
- Wells, J.N., Ventura, R.F., Eisenhauer, P.B., McKenna, D.C., Fine, R.E., Ullman, M.D., 1996. Transport of GM1 and GM1 inner ester across an in vitro model of the blood-brain barrier. *Neuroscience Letters* 217, 121-124.
- Wu, G., Lu, Z.H., Wang, J., Wang, Y., Xie, X., Meyenhofer, M.F., Ledeen, R.W., 2005. Enhanced susceptibility to kainite-induced seizures, neuronal apoptosis, and death in mice lacking ganglioside GM1: protection with LIGA20, a membrane-permeant analog of GM1. *Journal of Neurosciences* 25, 11014-11022.
- Yamamoto, N., Matsubara, T., Sato, T., Yanagisawa, K., 2008. Age-dependent high-density clustering of GM1 ganglioside at presynaptic neuritic terminals promotes amyloid beta-protein fibrillogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1778(12), 2717-2726.
- Yan, S.D., Chen, X., Fu, J., Chen, M., Zhu, H.J., Roher, A., Slattery, T., Zhao, L., Nagashima, M., Morser, J., Migheli, A., Nawroth, P., Stern, D., Schmidt, A.M., 1996. RAGE and amyloid- β peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature* 382, 685–691.

- Yanagisawa, K., 2007. Role of gangliosides in Alzheimer's disease (Review). *Biochimica et Biophysica Acta* 1768(8), 1943-1951.
- Yu, R.K., Saito, M., 1992. Gangliosides and neuronal-astrocytic interactions. *Progress in Brain Research* 94, 333-338.
- Zanchettim, G., Colombi, P., Manzoni, M., Anastasia, L., Caimi, L., Borsani, G., Venerando, B., Tettamanti, G., Preti, A., Monti, E., Bresciani, R., 2007. Sialidase NEU3 is a peripheral membrane protein localized on the cell surface and in endosomal structures. *Biochemical Journal*. 408(2), 211-219.
- Zha, Q., Ruan, Y., Hartmann, K., Beyreuther, D., Zhang, D., 2004. GM1 Ganglioside regulates the proteolysis of amyloid precursor protein. *Molecular Psychiatry* 9, 946-952.
- Zhang, H., Ding, J., Tian, W., Wang, L., Huang, L., Ruan, Y., Lu, T., Sha, Y., Zhang, D., 2009. Ganglioside GM1 binding the N-terminus of amyloid precursor protein. *Neurobiology of Aging* 30(8), 1245-1253.
- Zinser, E.G, Hartmann, T., Grimm, M.O.W., 2007. Amyloid beta-protein and lipid metabolism (Review). *Biochimica et Biophysica Acta* 1768(8), 1991-2001.

7. ANEXO

Neurochemistry International

The Journal of cellular and molecular neuroscience

Guide for Authors

The Journal of cellular and molecular neuroscience

I. General

Neurochemistry International is devoted to the rapid publication of outstanding original articles and timely reviews in neurochemistry. Manuscripts on a broad range of topics will be considered, including molecular and cellular neurochemistry, neuropharmacology and genetic aspects of CNS function, neuroimmunology, metabolism as well as the neurochemistry of neurological and psychiatric disorders of the CNS.

US National Institutes of Health (NIH) voluntary posting ("Public Access") policy

Elsevier facilitates author response to the NIH voluntary posting request (referred to as the NIH "Public Access Policy"; see <http://www.nih.gov/about/publicaccess/index.htm>) by posting the peer-reviewed author's manuscript directly to PubMed Central on request from the author, 12 months after formal publication. Upon notification from Elsevier of acceptance, we will ask you to confirm via e-mail (by e-mailing us at NIHauthorrequest@elsevier.com) that your work has received NIH funding and that you intend to respond to the NIH policy request, along with your NIH award number to facilitate processing. Upon such confirmation, Elsevier will submit to PubMed Central on your behalf a version of your manuscript that will include peer-review comments, for posting 12 months after formal publication. This will ensure that you will have responded fully to the NIH request policy. There will be no need for you to post your manuscript directly with PubMed Central, and any such posting is prohibited.

Exceptions: It is the policy of Elsevier that authors need not obtain permission in the following cases only: (1) to use their original figures or tables in their future works; (2) to make copies of their papers for use in their classroom teaching; and (3) to include their papers as part of their dissertations.

1. Types of communication

(a) *Papers reporting original research* are considered for publication provided that they describe significant, new and carefully confirmed findings and that adequate experimental details are given. All papers must be prepared according to the instructions given in Section III.

(b) *Rapid Communications* are those reporting original research and which are considered of such importance that publication is necessary within the shortest possible time. These papers should be between 1000 and 4000 words in length, and will be

published within 10 weeks of *acceptance*. When submitting a manuscript for publication as a rapid communication, authors should include a brief statement justifying the reason for its inclusion in the rapid publication section of the journal. (c) *Short Communications* - manuscripts of length up to a maximum of 3,000 words (including figure legends but not references), with no more than 1 figure and 1 table or 2 of either, will be considered for publication. Articles must be written in English, contain original experimental results, and should be complete in all respects. The layout and style should adhere strictly to the instructions given below and, in particular, the literature reference style (no more than 15 references).

(d) *Reviews* on a specific topic of neurochemistry written at the invitation of the Editors-in-Chief or submitted directly by any author will be considered. These need not only be exhaustive reviews, but can also be shorter articles intended either to draw attention to developments in a specific field for workers in other scientific disciplines, or to bring together observations over a wide area which seem to point in a new direction, to give the author's personal views on a controversial topic, or to direct soundly based criticism at some widely held dogma or widely used technique in neuroscience. Authors should always endeavour to make their reviews understandable to neuroscientists of other disciplines.

Language Editing:

Prior to submission, authors for whom English is not their first language may find it helpful to use a language and copyediting service such as that available through <http://www.elsevier.com/locate/languagepolishing> or may contact authorsupport@elsevier.com for more information. Please note that Elsevier neither endorses nor takes responsibility for any products, goods or services offered by outside vendors through our services or in any advertising. For more information please refer to our Terms & Conditions <http://www.elsevier.com/termsconditions>.

Online Submission:

Neurochemistry International manuscripts may be submitted using the journal's online submission and review Web site at <http://www.ees.elsevier.com/nci>. To use this submission route, please go to the Web site and upload your article and its associated artwork. A PDF is generated and the reviewing process is carried out using that PDF. All correspondence between editors, authors, and reviewers is performed on this system, and paper copies are no longer required. There are no submission fees or page charges. Each manuscript should be accompanied by a letter outlining the basic findings of the paper and their significance.

2. *Submission.*

To help ensure that papers are reviewed by the most suitable referees, authors can use their covering letter to provide a list of up to five candidate referees (including names, addresses, fax and e-mail) who do not have conflict of interest in the research being submitted. The Editors reserve the right to choose different referees from the ones suggested.

3. *Refereeing.* Every manuscript received by the Editors-in-Chief will be refereed by at

least two specialists (who may or may not be members of the Editorial Advisory Board). The final decision on the acceptance of a manuscript will lie with the Editor-in-Chief and/or the Associate Editors, who will act on the advice of the referees.

4. *Submission of manuscripts to Neurochemistry International* will be held to imply that they represent original research not previously published (except in the form of an abstract or preliminary report) and that they are not being considered for publication elsewhere in similar form, in any language, without the consent of the publishers.

5. Authors are encouraged to submit a computer disk containing the final version of the papers along with the final manuscript to the office of the appropriate Editor-in-Chief. Please observe the following criteria:

- (a) Send only hard copy (i.e. no disk) when first submitting your paper.
- (b) When your paper has been refereed, revised if necessary and accepted, send a disk containing the final version with the final hard copy. Make sure that the disk and the hard copy match exactly.
- (c) Specify what software was used, including which release, e.g. WordPerfect 5.1.
- (d) Specify what computer was used (either IBM-compatible PC or Apple Macintosh).
- (e) Include the text file and separate table and illustration files, if available.
- (f) The file should follow the general instructions on style/arrangement and, in particular, the reference style of this journal as given in the Instructions to Authors.
- (g) The file should be one and a half or double spaced and should use the wrap-around end of line feature, i.e. no returns at the end of each line. All textual elements should begin flush left; no paragraph indents. Place two returns after every element such as title, headings, paragraphs, figure and table call-outs.
- (h) Keep a back-up disk for reference and safety.

6. Offprints: The corresponding author, at no cost, will be provided with free e-offprints, in the form of a PDF file of the article, via e-mail. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use.

Additional paper offprints can be ordered by the authors. An order form with prices will be sent to the corresponding author.

Copyright:

Upon acceptance of an article, authors will be asked to Transfer copyright. This transfer will ensure the widest possible dissemination of information. If material from other copyrighted works is included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has pre-printed forms for use by authors in these cases: contact Elsevier Rights Department, P.O. Box 800, Oxford, OX5 1DX, UK, phone: (+44) 1865 843830, fax: (+44) 1865 853333, e-mail: permissions@elsevier.com. Requests may also be completed online via the Elsevier home page (<http://www.elsevier.com/locate/permissions>)

Colour Figures:

If together with your accepted article, you submit usable colour figures, then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in colour on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether these illustrations are

reproduced in colour in the printed version. For colour reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions> [Please note: Because of technical complications that can arise in converting colour figures to "grey scale" (for the printed version should you not opt for colour in print), please submit in addition usable black-and-white files corresponding to all the colour illustrations].

Authors should note that a request to revert from full colour to colour only in the electronic publication at the stage of typesetting and proof correction, will require separate editorial agreement, with possible re-review if necessary, and may significantly delay publication of your manuscript.

7. Proofs Proofs will be sent to the author (first-named author if no corresponding author is identified on multi-authored papers) by PDF wherever possible and should be returned within 48 hours of receipt, preferably by e-mail. Corrections should be restricted to typesetting errors; any other amendments made may be charged to the author. Any queries should be answered in full. Elsevier will do everything possible to get your article corrected and published as quickly and accurately as possible. Therefore, it is important that all of your corrections are returned to us in one all-inclusive e-mail or fax. Subsequent additional corrections will not be possible, so please ensure that your first communication is complete. Should you choose to mail your corrections, please return them to: Log-in Department, Elsevier, Stover Court, Bampfylde Street, Exeter, Devon, EX1 2AH, UK.

II. Experimental Procedures

All experiments on human subjects should be conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. Manuscripts must be accompanied by a statement that all procedures were carried out with the adequate understanding and written consent of the subjects.

All animal experiments should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 80-23, revised 1978).

Manuscripts should be accompanied by a statement that all efforts were made to minimize animal suffering, to reduce the number of animals used, and to utilize alternatives to *in vivo* techniques, if available.

Authors are advised to consult "A fair press for animals" [*New Scientist* (1992) 1816: 18-30] before preparing their manuscript.

The Editors-in-Chief reserve the right to reject papers if there is doubt whether suitable procedures have been used.

III. Manuscript requirements

1. Form

(a) Manuscripts should be typewritten with one and a half or double spacing throughout and with margins at least 2.5 cm wide. If possible, A4 size (210 x 297 mm) paper should be used. Four copies of each manuscript should be submitted to facilitate reviewing by referees. It is only necessary to send photocopies of diagrams, or rough prints of halftones, with the third and fourth copies.

(b) Each manuscript must have a title page which includes only the title, the authors' names, the laboratory or origin, the name and address of the person to whom proofs should be mailed, including a Fax number and e-mail address where possible, and any necessary footnotes. The title of the paper should be brief; no longer than 100 characters in length, and should capture and communicate the key message of your research to a broader audience. To aid this, abbreviations, unless familiar to a broad audience, should be avoided. Original manuscripts and diagrams are discarded 1 month after publication unless the Publisher is requested to return original material to the author. Corrections to the proof should be restricted to printer's errors. Substantial alterations may be charged to the author. Please note that authors are urged to check their proofs carefully before return, since late corrections to any articles cannot be guaranteed for inclusion in the printed journal.

(c) The title should be as short as is consistent with clarity. Papers should not be numbered in series, but sub-titles are accepted.

(d) A running title, not to exceed 56 letters and spaces, should be included on a separate sheet.

(e) Pages should be numbered in succession, the title page being page 1.

(f) Tables and figures should be on separate pages placed at the end of the manuscript. Their desired approximate locations should be indicated in the margin of the text.

(g) Footnotes to the text should be used sparingly; where they must be used their locations should be indicated by superscript numbers, and they should be typed with corresponding numbers on a separate sheet. In Tables, reference to footnotes should be made by the symbols *, †, ‡, §, ||, ¶ in that order.

(h) Greek characters should be clearly identified.

(i) Isotopic specifications should conform to the IUPAC system [*Biochem. J.* (1975) 145, 1-20].

(j) *Drug names should be the official or approved names*: trade names or common names may be given in brackets where the drug is first mentioned. The manufacturer's name must be given. The doses of the drugs should be given as unit weight/unit body weight, e.g. mmol/kg or mg/kg. Concentrations should be given in terms of molarity, e.g. nM or μ M, or as unit weight/volume solution, stating whether the weight refers to the salt or the active component of the drug. The molecular weight, inclusive of water of crystallization, should be stated if doses are given as unit weight.

(k) The IUB Enzyme Commission (EC) number must be quoted with the full name of the enzyme when it is first mentioned in the text. Subsequently the accepted trivial name should be used, e.g. *Full name*: Acetyl-CoA: choline *O*-acetyl transferase (EC 2.3.1.6.) *Trivial name*: Choline acetyltransferase not choline acetylase. For this information the author should refer to *Enzyme Nomenclature* (1973), Elsevier, Amsterdam and the supplement in *Biochim. Biophys. Acta* (1976) 429, 1-45.

2. Style

(a) Manuscripts should be concisely written in English in a readily understandable style. Technical jargon, 'laboratory slang' or words not denied in dictionaries should not be

used. Abbreviations should be avoided unless they conform to the instructions under sub-section 6. They must not be used as a short form for experimental procedures or for concepts.

(b) Redundant words, phrases, and sentences should not be used. For example, the captions of Tables and Figures, with or without paraphrasing, should not be repeated in the text. The Editors reserve the right to revise the wording of manuscripts accepted for publication in *Neurochemistry International*.

Authors should familiarize themselves with the format and style of recently published papers.

3. Organization

(a) Each paper must begin with a brief *Abstract*. It should not exceed 300 words. The first paragraph of the abstract should summarize the results obtained, the final paragraph should summarize the major conclusions in such a way that a reader not familiar with the techniques used can see any implications for his area of neuroscience. Abbreviations must not be used in the Abstract.

(b) The remaining text of all papers, however short, should be organized in the following four main sections:

(i) An *introductory statement* should first 'set the scene' for a non-specialist and then continue with the specific reasons for undertaking the investigation. Exhaustive reviews of the literature should be avoided and no attempt should be made to indicate the results obtained. The heading 'Introduction' should be omitted.

(ii) *Experimental procedures*. Procedures used should be given in sufficient detail to permit the repetition of the work by others. However, published procedures should only be briefly summarized and only described in detail if they have been substantially modified. Special chemicals, drugs, etc. with their sources of supply should be grouped under a separate subheading *Materials*.

(iii) *Results*. In this section findings should be described without discussion of their significance. Sub-sections should be used in order to clarify the expression of the results.

(iv) *Discussion*. In this section the authors' interpretations of their findings should be accompanied by an assessment of their significance in relation to previous work. Repetition of material given under 'Results' should be avoided. *Sub-sections should be used wherever possible* and sub-sections dealing with technical or highly specialized matter should be clearly separated from the rest of the text so that they can be printed in small type.

4. Presentation of data in tables or figures

(a) In general, tables and figures should be so constructed that they, together with their captions and legends, will be intelligible with minimal reference to the text.

(b) Each figure must be accompanied by a caption and explanatory legend typed on a separate sheet.

(c) Care should be taken to present data in a precise manner. For example, histograms should not be used when the data can equally well be given in a Table.

(d) *Figures*:

(i) Each figure must have its number, the authors' names and '*Neurochemistry International*' written lightly on the reverse side.

(ii) Line drawings should be on white card or paper. Where possible, illustrations should be submitted in a form *suitable for direct reproduction*. Delay in publication is inevitable if figures require redrawing. Line drawings should normally be about twice

the final size; in no case should the dimensions exceed 20 x 30 cm.

(iii) Symbols on graphs, etc. should be inserted by the author using the following standard characters:

^ • ~ ~ [] [] X +

Supplementary material:

Electronic supplementary material is now accepted to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please ensure that data is provided in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our Corporate Website at <http://www.elsevier.com/authors>.

5. References

(a) In the text, references should be quoted by giving author's name, followed by the year of publication in parentheses. For more than two authors, the name of the first author is given followed by the words 'et al.'.

(b) The reference list should be typed separately at the end of the manuscript in alphabetical order and arranged as follows: author's name and initials, year, title of the article, full journal title, volume, *first* and *last* page numbers.

For example:

Betz, H., Becker, C.-M., 1988. The mammalian glycine receptor: biology and structure of a neuronal chloride channel protein. *Neurochemistry International* 13, 137-146.

References to books should include the author's name and initials, year, title of book, volume, page numbers, publisher and place of publication. Where relevant, the title of a paper within a book, and the editor's names, should be given.

For example:

Baker, P. F., 1972. The sodium pump in animal tissues and its role in the control of cellular metabolism and function. In: Hopkin, L. E. (Ed.) *Metabolic Pathways*. Vol. 6, Academic Press, New York, pp. 243-268.

(c) *Unpublished experiments may be mentioned only in the text; they must not be included in the list of References*; initials as well as surnames must be given for authors whose unpublished experiments are quoted.

(d) A paper which has been accepted for publication but which has not appeared may be cited in the References with the abbreviated name of the Journal followed by the words 'In press'. The date of acceptance of each such paper should be indicated when the manuscript is submitted to *Neurochemistry International*.

(e) Personal communications may only be used when written authorization from the communicator is submitted with the original manuscript: they may only be mentioned in the text.

6. Abbreviations

(a) Symbols for physical units should be restricted to the Système Internationale (S.I.)

Units. Examples of commonly used symbols can be found in *Biochem J.* (1975) 145, 1-20 and more detailed description, in *Quantities, Units and Symbols* (1971) The Royal Society, London.

(b) The *excessive use of abbreviations in the text is strongly discouraged*. In particular, awkward and unfamiliar abbreviations and those intended to express concepts or experimental techniques will not be permitted. In order to aid communication between scientists of different disciplines, authors should only use abbreviations sparingly and should always define the abbreviation when first used by placing it in parentheses after the full term, e.g. Acetylcholinesterase (AChE).

7. Chemical and biochemical nomenclature

As far as possible authors should follow the conventions used in *The Biochemical Journal*. See *Biochem J.* (1975) 145, 1-20.

Author enquiries: For enquiries relating to the submission of articles (including electronic submission where available) please visit this journal's EES page. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle> and set up e-mail alerts to inform you of when an article's status has changed, as well as copyright information, frequently asked questions and more. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, are provided after registration of an article for publication

Disclaimer:

Whilst every effort is made by the publishers and editorial board to see that no inaccurate or misleading data, opinion or statement appears in this journal, they wish to make it clear that the data and opinions appearing in the articles and advertisements herein are the sole responsibility of the contributor or advertiser concerned. Accordingly, the publishers, the editorial board and editors and their respective employees, officers and agents accept no responsibility or liability whatsoever for the consequences of any inaccurate or misleading data, opinion or statement.