

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

**PAPEL DO ÓXIDO NÍTRICO E DE CANAIS DE  
POTÁSSIO NA VASODILATAÇÃO INDUZIDA PELO  
GANGLIOSÍDEO GM1**

**ANA FLÁVIA FURIAN**

**Orientador: Prof. Dr. Carlos Fernando de Mello**

Porto Alegre, RS

2009

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

**PAPEL DO ÓXIDO NÍTRICO E DE CANAIS DE  
POTÁSSIO NA VASODILATAÇÃO INDUZIDA PELO  
GANGLIOSÍDEO GM1**

**ANA FLÁVIA FURIAN**

**Orientador: Prof. Dr. Carlos Fernando de Mello**

Tese apresentada  
ao Programa de Pós-Graduação em  
Ciências Biológicas: Bioquímica, da  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
como requisito parcial à obtenção do  
grau de Doutor em Bioquímica

Porto Alegre, RS

2009

Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Instituto de Ciências Básicas da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica

### **Comissão Examinadora**

Prof Dr. Carlos Fernando de Mello (UFSM)  
(Presidente/Orientador)

Prof<sup>a</sup> Dra. Vera Maria Treis Trindade (UFRGS)

Prof Dr. Jamil Assreuy (UFSC)

Prof Dr. Rafael Roesler (UFRGS)

Prof Dr. Marino Muxfeldt Bianchin (UFRGS)

Porto Alegre, 2009

*Essa tese é dedicada aos meus pais,  
Maria Helena e Clóvis Furian!*

*“A mente que se abre a uma nova idéia jamais  
voltará ao seu tamanho original.”*

*Albert Einstein*

## AGRADECIMENTOS

*Aos meus pais, Maria Helena e Clóvis, que nunca mediram esforços para que eu conseguisse alcançar os objetivos. Amo vocês!!!*

*Aos meus irmãos, Ana Paula e Eduardo, e a minha cunhada Sandra pelo apoio; aos meus sobrinhos Pedro Henrique e Maria Eduarda pelos fins de semana divertidos e alegres;*

*Ao Mauro, muito mais que meu amor, meu amigo, colega, meu companheiro e incentivador, minha maior descoberta que me ensinou muito e que sempre esteve ao meu lado durante toda a realização deste trabalho, mesmo do Texas, do Canadá...!! Obrigada pelo amor, carinho, paciência, apoio e incentivo. Te amo muito;*

*Ao Prof. Carlos Mello, por ter me concedido a oportunidade de trabalhar sob sua orientação, por sua ajuda e confiança no meu trabalho e principalmente pela amizade e experiência. Agradeço também a “permissão” para ter assumido ao cargo de professora substituta no Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFSM, junto com a matrícula no doutorado;*

*Ao Nando, pelo auxílio, interesse, incentivo, confiança e amizade;*

*A Dani e a Mauren que me ajudaram na realização deste trabalho, foram amigas e parceiras em todos os momentos;*

*Aos colegas do laboratório do 18 e principalmente do 21, o “pessoal da convulsão”, as “gurias da pirexia”, a “galera da Educação Física”, pelo incentivo, amizade, confiança, atenção e principalmente pelos momentos de descontração;*

*A Yanna pela ajuda, disponibilidade e amizade que iniciaram com os experimentos em Curitiba. Agradeço também a sua família que me acolheu durante este tempo;*

*A Prof. Maria Consuelo e especialmente ao Prof. Adair pela oportunidade, disponibilidade e ajuda na realização dos experimentos com órgão isolado;*

*Aos professores do Programa de Pós-graduação em Bioquímica Toxicológica da UFSM, especialmente o Prof. Juliano Ferreira, pela constante disponibilidade, sugestões, e exemplo de profissional;*

*À minha família que sempre acreditou, me apoiou e me deu força;*

*A todos aqueles que de alguma maneira contribuíram para a realização desse trabalho, o meu muito obrigado!*

*A TRB Pharma pela doação do gangliosídeo GM1;*

*Aos animais, que deram suas vidas para o desenvolvimento deste trabalho;*

*Agradeço a Universidade Federal do Rio Grande do Sul pela oportunidade, e ao CNPq pelo apoio financeiro.*

## RESUMO

O monossilotetra-hexosilgangliosídeo (GM1) é um glicoesfingolípido presente nas membranas celulares que exerce propriedades antioxidantes e neuroprotetoras. Os mecanismos neuroquímicos envolvidos na neuroproteção induzida pelo GM1 não são completamente conhecidos. Recentemente, foi demonstrado que o GM1 aumenta a quantidade da enzima catalase no SNC por causar vasodilatação, e sugeriu-se que a vasodilatação possa ser responsável pelas suas propriedades neuroprotetoras. Contudo, o mecanismo pelo qual o GM1 causa vasodilatação não foi determinado. Dado o papel central do óxido nítrico (NO), bem como de canais de potássio no controle do tonus do músculo liso, o objetivo deste trabalho foi determinar a participação do NO e de canais de  $K^+$  na vasodilatação induzida pelo GM1.

Primeiramente, avaliamos o efeito da administração de L-NAME (metil éster de  $N^G$ -nitro- L-arginina, 60 mg/kg, i.p.), um inibidor da enzima óxido nítrico sintase (NOS), na vasodilatação cerebral induzida pelo GM1 (50 mg/kg, i.p.) em ratos Wistar machos adultos. Verificamos que o L-NAME preveniu o aumento do diâmetro dos vasos cerebrais induzido pelo GM1. Tendo em vista a participação do NO no efeito vasodilatador do GM1, determinamos o conteúdo de nitritos e nitratos (NOx), bem como de hemoglobina (Hb) no hipocampo e no córtex cerebral, 15, 30 e 60 min após a administração de GM1. Observamos um aumento no conteúdo de Hb e uma redução dos níveis de NOx após 60 min. Dado que nitritos e nitratos podem ser removidos *in vivo* pelo sangue por ligação com a Hb, um possível efeito do GM1 sobre o conteúdo de NOx poderia ser mascarado. No intuito de contornar essa situação, determinamos os níveis de NOx em fatias de córtex cerebral incubadas com GM1 (0, 10, 30 e 100  $\mu$ M). Verificamos que o GM1 (100  $\mu$ M) aumentou os níveis de NOx em 30 min e reduziu o conteúdo em 60 min, sem alterar o conteúdo de Hb. Ainda, mostramos que o L-NAME (100  $\mu$ M) reverte o aumento de NOx induzida pela incubação com GM1 (100  $\mu$ M, por 30 minutos) em fatias de córtex cerebral, sem alterar o conteúdo de Hb.

Tendo em vista a participação do NO no efeito vasodilatador do GM1, e conhecendo a capacidade de ligação da Hb com o NO, determinamos a via de relaxamento muscular mediada pelo NO em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos. Verificamos que o GM1 causou relaxamento vascular através de uma curva cumulativa de concentrações (10 nM a 3 mM), e também determinamos que a participação do endotélio é fundamental para este efeito. O efeito vasorelaxante do GM1 além de ser dependente da presença do endotélio vascular, é completamente bloqueado pela presença de L-NAME (1  $\mu$ M), da mesma forma que os resultados encontrados nos experimentos com vasos cerebrais. Considerando que o NO formado no endotélio ativa a guanilato ciclase (GCs), também testamos o efeito do inibidor desta enzima (ODQ-1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3- $\alpha$ ]quinoxalin-1-one) no efeito vasorelaxante do GM1. Neste caso, o efeito do GM1 foi bloqueado parcialmente pelo ODQ (10  $\mu$ M). Além da participação da GCs, avaliamos o papel dos canais de  $K^+$  no efeito vasorelaxante do GM1. Verificamos que o tetraetilamônio (1 mM), um bloqueador não seletivo, assim como a glibenclamida (10  $\mu$ M), bloqueador dos canais de  $K^+$  sensíveis ao ATP bloquearam parcialmente o efeito do GM1. Por outro lado, a apamina (50 nM), um bloqueador de canais de  $K^+$  dependentes voltagem e  $Ca^{2+}$  (KCa) de baixa condutância não alterou o efeito do GM1, enquanto que a caribdotoxina (50 nM), um bloqueador de KCa de alta condutância deslocou a curva de relaxamento para a direita.

Em resumo, neste trabalho mostramos a participação do NO e dos canais de  $K^+$  na vasodilatação induzida pelo GM1. Embora mais estudos sejam necessários para estabelecer o mecanismo vasodilatador do GM1, sugerimos que uma terapia adjunta com GM1 ou com drogas correlatas é válida em condições clínicas onde o aumento do fluxo sanguíneo é associado a um melhor prognóstico, como doenças vasculares obstrutivas e doenças neurodegenerativas.



## ABSTRACT

Monosialotetra-hexosylganglioside (GM1) is a glycosphingolipid present in most cell membranes which displays antioxidant and neuroprotective properties. Additionally, it has been recently demonstrated that GM1 increases catalase content in the CNS due to vasodilation, and it has been suggested that vasodilation may be responsible, at least in part, for the neuroprotective properties of GM1. However, the mechanisms underlying GM1-induced vasodilation have not been determined. Given the pivotal role of nitric oxide and potassium channels in the control of vascular tonus, we decided to investigate whether these mediators are involved in the vasodilation induced by GM1.

Initially, we investigated the effect of L-NAME ( $N^G$ -nitro-L-arginine methyl ester, 60 mg/kg, i.p.), an inhibitor of nitric oxide synthase (NOS), on the cerebral vasodilation induced by GM1 (50 mg/kg, i.p.) in male wistar rats. L-NAME fully prevented the increase in outer diameter of pial vessels induced by GM1. In addition, we investigated the content of stable NO end products, namely, nitrites and nitrates (NOx), as well as the content of the hemoglobin (Hb) in the hippocampus and cerebral cortex 15, 30 and 60 min after GM1 administration. Interestingly, GM1 increased Hb content and decreased NOx content 60 min after administration. Since it has been demonstrated that NO end products like NOx can be removed from brain *in vivo* by blood flow, a possible effect of GM1 on NOx levels could be masked. Therefore, we decided to investigate the effect of GM1 (0, 10, 30 e 100  $\mu$ M) on NOx content in slices of cerebral cortex. The incubation of slices with GM1 (100  $\mu$ M) for 30 min significantly increased NOx levels. In addition, we observed decreased NOx levels after 60 min of incubation, without changes in Hb content. In order to obtain pharmacological evidence for the role of nitric oxide synthase (NOS) in GM1-induced increase of NOx content *in situ*, cortical slices were incubated with L-NAME (100  $\mu$ M) in the presence or absence of GM1 (100  $\mu$ M) for 30 minutes, and the NOx content was measured. L-NAME blunted GM1-induced increase of NOx content.

Since it has been demonstrated that GM1 induces pial vessel vasodilation and increases NOx content in cerebral cortex, which are fully prevented by the nitric oxide synthase inhibitor L-NAME, we further investigated whether GM1 relaxes larger vessels, as well as the mechanisms by which GM1 causes vasorelaxation. We found that GM1 (10, 30, 100, 300  $\mu$ M, 1 and 3 mM) induced vascular relaxation of the rat mesenteric artery, as determined by isometric tension studies in arterial rings contracted with 1  $\mu$ M phenylephrine. The vasorelaxation induced by GM1 was abolished by endothelium removal, by incubation with L-NAME (1  $\mu$ M) and partially inhibited by the blockade of potassium channels by 1 mM tetraethylammonium, 10  $\mu$ M glibenclamide, by the soluble guanylate cyclase inhibitor 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3- $\alpha$ ]quinoxalin-1-one (10  $\mu$ M), and by 50 nM charybdotoxin, a blocker of large and intermediate conductance calcium-activated potassium channels. Moreover, GM1-induced relaxation was not affected by apamin (50 nM), a small conductance calcium-activated potassium channel blocker.

Altogether, these results indicate that nitric oxide and potassium channels participate in the vasodilation induced by GM1. Although more studies are necessary to definitely establish the mechanisms underlying the GM1-induced vasodilation, we suggest that vasodilation may underlie some of the biological effects of exogenous GM1 ganglioside and that adjunct therapy with GM1 may be of value in clinical conditions in which increased blood flow is associated to a better prognosis, such as obstructive vascular and neurodegenerative diseases.

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACh	acetilcolina
Akt	proteína serina treonina quinase, conhecida como proteína quinase B
ANOVA	análise de variância
BH4	tetrahidrobiopterina
BKCa	canais de potássio ativados por $Ca^{2+}$ de alta condutância
CaM	calmodulina
ChTX	caribdotoxina
EDHF	fator hiperpolarizante derivado do endotélio
eNOS	óxido nítrico sintase endotelial
iNOS	óxido nítrico sintase induzida
ERK1/ERK2	quinase regulada por sinal extracelular 1 ou 2
FAD	dinucleotídeo de flavina e adenina
FMN	mononucleotídeo de flavina
GCs	guanilato ciclase solúvel ou citosólica
GLB	glibenclamida
GM1	monossialotetra-hexosilgangliosídeo GM1
GMP	guanosina 5' - monofosfato
GMPC	guanosina 3',5' - monofosfato cíclico
GPx	glutathione peroxidase
GTP	guanosina 5'-trifosfato
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenoso
IKCa	canais de potássio ativados por $Ca^{2+}$ de condutância intermediária
KATP	canais de potássio sensíveis ao ATP
KCa	canais de potássio ativados por $Ca^{2+}$
KIR	canais de potássio retificadores
KV	canais de potássio sensíveis à voltagem
L-NAME	metil éster de $N^G$ -nitro- l-arginina
MAPK	família de proteínas quinases ativadas por mitógenos
MLC	cadeia leve de miosina
MLCK	quinase da cadeia leve da miosina
NADPH	dinucleotídeo nicotinamida adenina fosfato (reduzida)

NGF	fator de crescimento neural
NMDA	N-metil-D-aspartato
nNOS	óxido nítrico sintase neuronal
NO	óxido nítrico
NO <sub>2</sub>	nitrito
NO <sub>3</sub>	nitrato
NOS	óxido nítrico sintase
NO <sub>x</sub>	nitritos e nitratos
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	radical superóxido
ODQ	1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3- $\alpha$ ]quinoxalin-1-one
PGI <sub>2</sub>	prostaciclina ou prostaglandina I <sub>2</sub>
Phe	fenilefrina
PI3K	fosfatidil-inositol 3-quinase
PKC	proteína quinase C
PKG	proteína quinase G
SGB	síndrome de Guillain Barré
SKCa	canais de potássio ativados por Ca <sup>2+</sup> de baixa condutância
SNC	sistema nervoso central
SOD	superóxido dismutase
TEA	tetraetilamônio
Trk	receptores de tirosina quinases
TrkA	receptor de tirosina quinase do tipo A
TrkB	receptor de tirosina quinase do tipo B
TrkC	receptor de tirosina quinase do tipo C

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Estrutura química (A) e fórmula estrutural (B) do Monossialotetrahexosilgangliosídeo (GM1).....	2
<b>Figura 2:</b> Rotas da síntese das séries ‘o’, ‘a’, ‘b’ e ‘c’ dos gangliosídios.....	5
<b>Figura 3:</b> Corte transversal da parede arterial enfatizando a camada adventícia, a camada média, constituída por células musculares lisas, e a camada íntima ou endotelial, constituída por uma linha única de células endoteliais.....	16
<b>Figura 4:</b> Fatores vasorrelaxantes produzidos pelo endotélio vascular.....	19
<b>Figura 5:</b> Ações do Óxido Nítrico no sistema nervoso Central e Periférico.....	21
<b>Figura 6:</b> Estrutura e atividade catalítica da NOS.....	22
<b>Figura 7:</b> Biossíntese do óxido nítrico (NO) em duas etapas, envolvendo hemo-oxidações.....	23
<b>Figura 8:</b> Representação dos domínios redutor e oxidante da NOS.....	24
<b>Figura 9:</b> Relaxamento do músculo liso vascular via produção de GMPc.....	27
<b>Figura 10:</b> Ilustração esquemática dos eventos envolvidos na resposta do músculo liso vascular a abertura (esquerda) e bloqueio dos canais de potássio (direita).....	29
<b>Figura 11:</b> Representação dos canais de potássio dependentes de voltagem $K_v$ .....	30
<b>Figura 12:</b> Proposição esquemática das vias ativadas por GM1 para induzir vasodilação em anéis de artérias mesentéricas superiores de ratos.....	85

## TABELA

<b>Tabela 1:</b> Família, abreviatura e estruturas das famílias de glicosfingolípídeos.....	3
---	---

# SUMÁRIO

<b>1. Introdução.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Gangliosídeos.....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Histórico.....	1
1.1.2 Estrutura Química e Nomenclatura .....	1
1.1.3 Localização .....	6
1.1.4 Funções dos Gangliosídeos .....	6
1.1.5 Efeitos Neuroprotetores do GM1.....	9
1.1.6 Síndrome de Guillain-Barré.....	12
1.1.7 Circulação Cerebral e GM1.....	14
<b>1.2. Estrutura e Funções dos vasos sanguíneos.....</b>	<b>15</b>
<b>1.3 Óxido Nítrico.....</b>	<b>19</b>
1.3.1 Síntese do Óxido Nítrico.....	21
1.3.2 Isoformas da Óxido Nítrico Sintase.....	23
1.3.3 Efeito relaxante do Óxido Nítrico.....	26
<b>1.4 Papel dos Canais de Potássio no controle do tônus vascular.....</b>	<b>28</b>
1.4.1 Subtipos de canais de Potássio .....	29
1.4.1.1 Canais de potássio sensíveis à voltagem ( $K_V$ ) .....	29
1.4.1.2 Canais de potássio ativados por $Ca^{2+}$ ( $K_{Ca}$ ) .....	30
1.4.1.3 Canais de potássio sensíveis ao ATP ( $K_{ATP}$ ) .....	31
1.4.1.4 Canais de potássio retificadores ( $K_{IR}$ ).....	32
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>35</b>
2.1 Objetivo Geral .....	35
2.2 Objetivos Específicos .....	35

<b>3. Resultados.....</b>	<b>37</b>
<b>3.1. Artigo 1</b>	
Furian, A.F., Schneider, M.O., Magni, D.V., Souza, M.A., Bortoluzzi, V.T., Bueno, L.M., Royes, L.F.F., Mello, C.F. “L-NAME prevents GM1 ganglioside-induced vasodilation in the rat brain”. <i>Neurochemistry International</i> 53(6-8):362-369, 2008.....	<b>38</b>
<b>3.2. Artigo 2</b>	
Furian, A.F., Rattmann, Y.D., Oliveira, M.S., Royes, L.F.F., Marques, M.C.A., Santos, A.R.S., Mello, C.F. “Nitric oxide and potassium channels mediate GM1 ganglioside-induced vasorelaxation”. .....	<b>47</b>
<b>4. Discussão.....</b>	<b>78</b>
<b>5. Conclusões .....</b>	<b>87</b>
<b>6. Referências Bibliográficas .....</b>	<b>88</b>

# **1. INTRODUÇÃO**

## **1.1 Gangliosídeos**

### **1.1.1. Histórico**

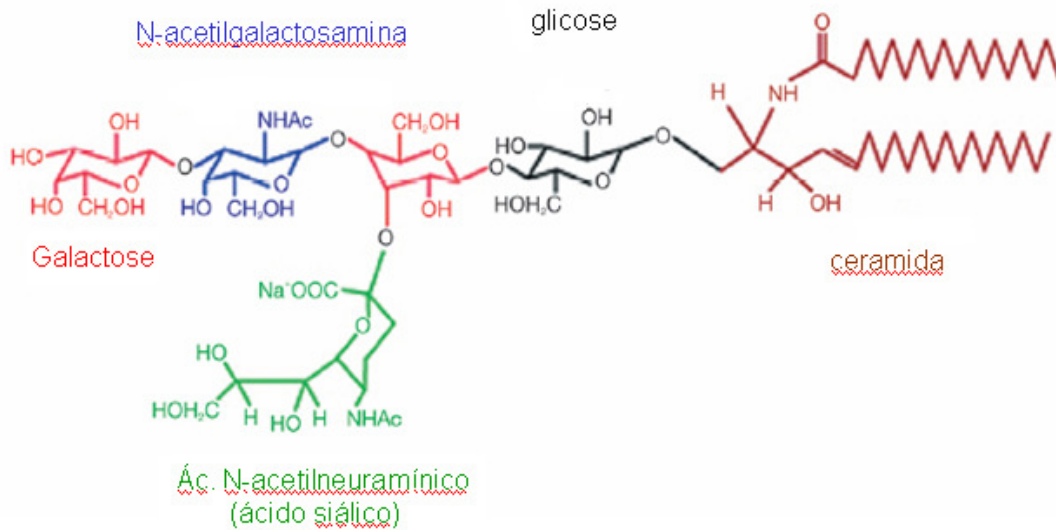
Os gangliosídeos foram primeiramente identificados na década de 30, por Ernest Klenk, que sugeriu o nome gangliosídeos devido à associação destes compostos com a matéria cinzenta do tecido cerebral, ou também chamada de *Gangliozellen* (Klenk, 1935). Durante os anos de 1950 e 1960, inúmeros estudos confirmaram a abundância dos gangliosídeos no cérebro e em células neurais (neurônios e glia), (Svennerholm, 1956; Derry and Wolfe, 1967) e sua onipresença sugere que eles têm papel importante na fisiologia celular. Sendo assim, sua alta concentração em neurônios em desenvolvimento e neurônios adultos, maior que 10% do conteúdo lipídico total, indica um papel crítico dos gangliosídeos no sistema nervoso (Ledeen, 1978).

### **1.1.2. Estrutura química e nomenclatura**

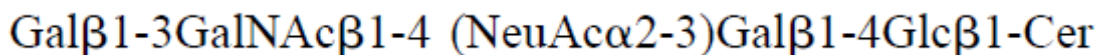
Gangliosídeos são glicoesfingolipídios cujo componente característico da molécula é o ácido siálico. O número de resíduos de ácido siálico por molécula de gangliosídeo varia de 1 a 7. O tipo de ácido siálico mais abundante nos gangliosídeos cerebrais é o N-acetil-neuramínico, seguido pelo N-glicolil-neuramínico (Figura 1) (Yu and Saito, 1992).



1 A



1 B



**Figura 1:** Estrutura química (A) e fórmula estrutural (B) do Monossialotetrahexosilgangliosídeo (GM1).

Fonte: Adaptado de Mocchetti, (2005).

Em termos estruturais, a cadeia oligossacarídica dos glicoesingolípídios une-se por meio de uma ligação  $\beta$ -glicosídica, a uma ceramida, que é constituída de uma cadeia de ácido graxo longo e uma esfingosina. A cadeia oligossacarídica pode ser formada por resíduos de glicose, galactose, N-acetilglicosamina, N-acetilgalactosamina e fucose, que em várias combinações conferem heterogeneidade aos diferentes tipos de glicoesingolípídeos. Estes compostos são classificados em diferentes famílias (gânglio, lacto, globo, gala, neolacto, isoglobo) com base na sequência de oses e no tipo de

ligação glicosídica entre elas (Tabela 1) (Chester, 1998 appud Degroote et al., 1994; Svennerholm, 1994).

<b>Família</b>	<b>Abreviatura</b>	<b>Estrutura</b>
Ganglio	Gg	Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\beta$ 1-4Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-Cer
Lacto	Lc	Gal $\beta$ 1-3GlcNAc $\beta$ 1-4Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-Cer
Neolacto	nLc	Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-4Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-Cer
Globo	Gb	GalNAc $\beta$ 1-3Gal $\alpha$ 1-4Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-Cer
Isoglobo	iGb	GalNAc $\beta$ 1-3Gal $\alpha$ 1-3Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-Cer

**Tabela 1:** Família, abreviatura e estruturas das famílias de glicoesfingolipídeos.

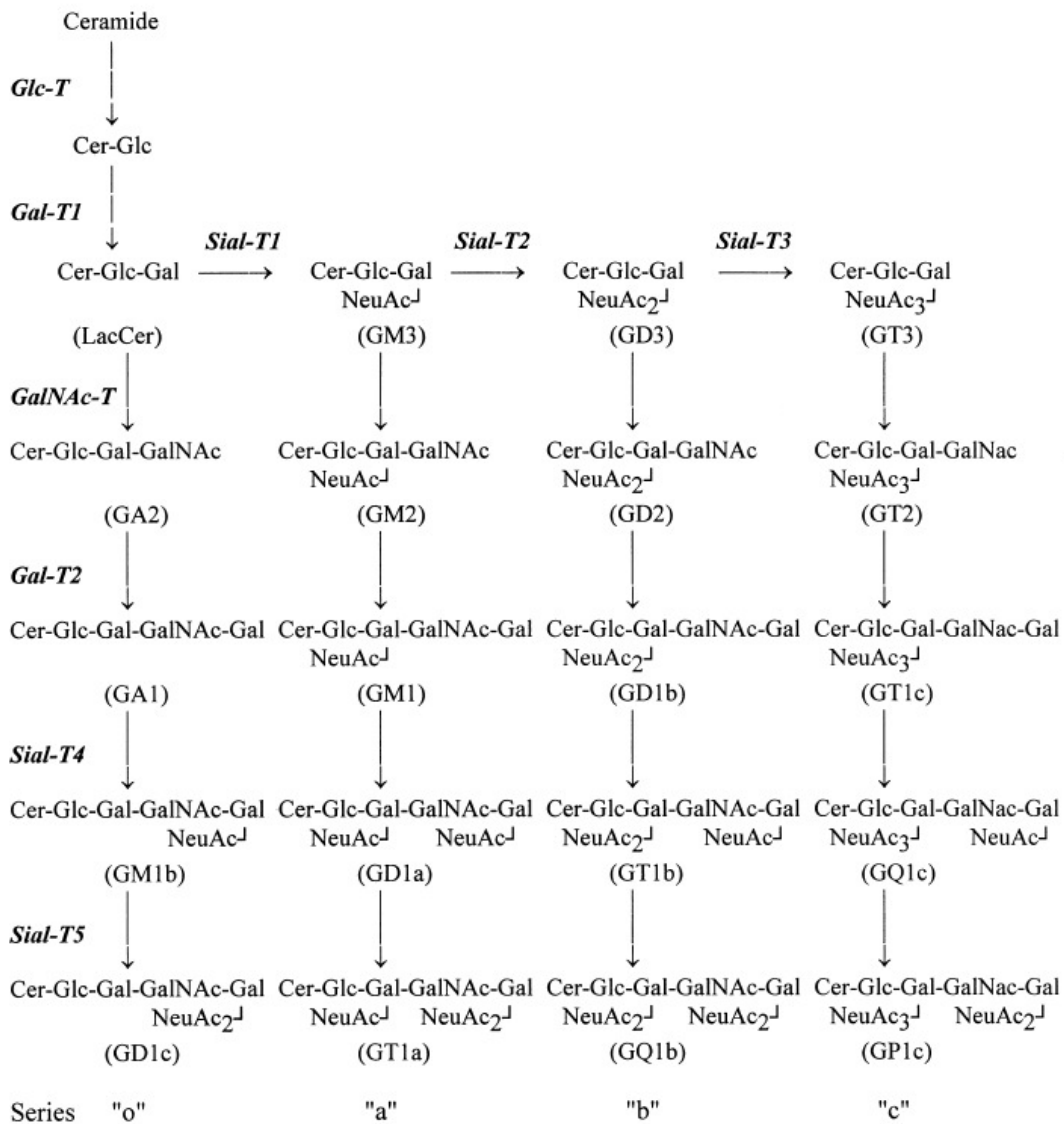
Fonte: Chester, MA. IUPAC-IUB (1997).

Disponível em <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/misc/glylp.html>

Os glicoesfingolipídios predominantes no tecido nervoso pertencem á família gânglio (Tettamanti and Riboni, 1993). Esta família de gangliosídeos devido às suas rotas de síntese possui 4 séries: o, a, b, c (Figura 2) (Maccione et al., 1999).

A nomenclatura mais utilizada para designar as diferentes espécies da família dos gangliosídeos foi proposta por Svennerholm (1963). Segundo este pesquisador, os gangliosídios recebem uma abreviatura conforme sua estrutura. Eles são denominados pela letra G, seguida da letra maiúscula M (Monossialo-), ou D (Dissialo-), ou T (Trissialo-), ou Q (tetrassialo-), ou P (Pentassialo-), ou H (Hexassialo-) ou S (Heptassialo-) de acordo com o número de resíduos de ácido siálico (1 a 7 respectivamente), seguido de um número que por convenção, é a subtração da quantidade de resíduos de açúcares neutros presentes na molécula, do número 5,

seguido de uma letra minúscula (a, b ou c) para distinguir as diferentes espécies de cada grupo mono, di, tri, tetrassialado. Assim, o monossialotetra-hexosilgangliosídeo GM1 (GM1a), que é considerado o protótipo da família gânglio e que será estudado neste trabalho, pertence a série “a” de rota de síntese dos gangliosídios; é constituído por um resíduo de ácido siálico (unido a galactose interna por uma ligação glicosídica  $\alpha$  2  $\rightarrow$  3) e quatro resíduos de oses neutras unidas entre si através de ligações glicosídicas  $\beta$  (Figuras 1 e 2) (Mocchetti, 2005).



**Figura 2:** Rotas da síntese das séries ‘o’, ‘a’, ‘b’ e ‘c’ dos gangliosídios. *Glc-T*, UDP-Glc:ceramida glicosiltransferase; *Gal-T1*, UDP-Gal:glicosilceramida galactosiltransferase; *GalNAc-T*, UDP-GalNAc:LacCer/GM3/GD3/GT3 *N*-acetilgalactosamiltransferase; *Sial-T1*, CMP-NeuAc:lactosilceramida sialiltransferase; *Sial-T2*, CMP-NeuAc:GM3 sialiltransferase; *Sial-T3*, CMP-NeuAc:GD3 sialiltransferase; *Sial-T4*, CMP-NeuAc:GA1/GM1/GD1b/GT1c sialiltransferase; *Sial-T5*, CMP-NeuAc:GM1b/GD1a/GT1b:GQ1b:GQ1c sialiltransferase. GlcCer, glicosilceramida; GalCer, galactosilceramida; LacCer, lactosilceramida. Gangliosídios nomeados segundo Svennerholm (1963). Fonte: Adaptado de Maccioni et al., 1999.

### **1.1.3. Localização**

Os gangliosídeos são componentes das membranas plasmáticas, localizando-se principalmente na parte externa dessas membranas (Hakomori, 1981) de todos os tecidos de vertebrados (Ledeen and Yu, 1982), concentrando-se mais no sistema nervoso (Wiegandt, 1985), onde representam cerca de 10 a 12% do conteúdo total de lipídios (Ledeen, 1978).

No cérebro de mamíferos os gangliosídeos predominantes são o GM1, o GD1a, o GD1b, o GT1b e o GQ1b, os quais correspondem de 80 a 90% do total de gangliosídeos (Ando et al., 1978). No tecido nervoso dos vertebrados, os gangliosídeos estão localizados assimetricamente na camada externa da membrana plasmática, com a porção oligossacarídica exposta na superfície extracelular e a porção ceramida inserida na membrana, em contato com os vários componentes lipídicos e protéicos (Tettamanti and Riboni, 1993). Devido a essa distribuição assimétrica, e também à sua diversidade química, os gangliosídeos estão sujeitos a interações com moléculas sinalizadoras extracelulares (Dal Toso et al., 1988). Além disso, os gangliosídeos se encontram em menor quantidade em regiões intracelulares, particularmente ligados a organelas que exercem importantes funções de sinalização, transporte e funções metabólicas (Gillard et al., 1993). Neste sentido, foi sugerida a presença de GM1 no envelope da membrana nuclear em células de neuroblastoma e em culturas primárias de neurônios do sistema nervoso central e periférico, indicando também a participação do GM1 na regulação da atividade do trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (Wu et al., 1995; Kozireski-Chuback et al., 1999a, b, c).

### **1.1.4. Funções dos gangliosídeos**

Muitos estudos sugerem a participação dos gangliosídeos no desenvolvimento neuronal, na sinaptogênese e na transmissão sináptica. A participação dos gangliosídeos

nos processos de crescimento, reconhecimento e diferenciação celular (Hakomori, 1981) foi sugerida devido a aumentos significativos no conteúdo dos principais gangliosídeos durante alguns estágios da diferenciação neuronal sugerindo uma necessidade funcional dessas substâncias nos processos de neuritogênese e sinaptogênese (Vanier et al., 1971). Além do crescimento celular, a maturação do SNC parece ser particularmente influenciada por esses glicoesfingolipídios, uma vez que a concentração e a topografia de certos tipos de gangliosídeos sofrem importantes mudanças durante o desenvolvimento cerebral (Karpiak and Mahadik, 1990). Neste sentido, foi proposto que gangliosídeos individuais podem ser usados como marcadores dos estágios de diferenciação celular, sendo que o GD3 e o GD2 estão relacionados com a proliferação celular; o GT1a, GT1c, GQ1c e o GP1c com o crescimento dos neuritos e arborização; o GD1a e o GT1b com a formação das sinapses e o GM1 e o GM4 com a mielinização (Rahmann, 1995). Em adição, a administração intracraniana de anticorpos anti-gangliosídeos em ratos recém nascidos, induz alterações morfológicas (reduz o número de dendritos) e funcionais (dificuldade de aprendizado) que são detectadas no período adulto. O mesmo ocorre *in vitro*, ou seja, a incubação com anticorpos anti-gangliosídeos inibe o crescimento de neuritos em culturas de neurônios (Schwartz and Spirman, 1982; Spirman et al., 1982).

As propriedades neuritogênicas (que envolvem aumento no número, tamanho e/ou ramificação dos neurônios) e neurotróficas (relacionados à sobrevivência e manutenção do neurônio) dos gangliosídeos podem estar relacionadas a potencialização da ação do fator de crescimento neural (NGF) promovida por estas substâncias. Contudo, os mecanismos pelos quais os gangliosídeos potencializam as ações do NGF ainda são controversos (Gonatas et al., 1983; Rabin and Mocchetti, 1995). Foi proposto

que o GM1 não só mimetiza, mas também potencializa a ação de neurotrofinas em alguns sistemas neuronais *in vivo* (Hadjiconstantinou and Neff, 1998a, b).

Farooqui e colaboradores (Farooqui et al., 1997) sugerem que os efeitos neurotróficos exercidos pelo GM1 se devem à facilitação da dimerização e conseqüente ativação dos receptores de tirosina quinase do tipo A (TrkA). Contudo, sabe-se que o GM1 induz a ativação de três receptores para neurotrofinas: TrkA>TrkC>TrkB (Duchemin et al., 2002). Foi mostrado que a fosforilação dos receptores de tirosina quinases (Trk) e sua ativação no cérebro *in situ* e *in vivo*, pelos gangliosídeos, inicia uma transdução de sinal que resulta na ativação das quinases reguladas por sinal extracelular 1 e 2 (ERK1 e ERK2) (Singleton et al., 2000; Duchemin et al., 2002; Mo et al., 2005).

A presença de altas concentrações de gangliosídeos nas terminações sinápticas levou à investigação de um possível papel dessas substâncias na neurotransmissão (Hadjiconstantinou and Neff, 1998b). De fato, foi verificado que os gangliosídeos localizados nos terminais sinápticos ligam cálcio com grande afinidade e, portanto, são candidatos a carreadores do cálcio necessário para a liberação de neurotransmissores (Svennerholm, 1980). Sendo assim, diversos estudos atribuem efeitos dos gangliosídeos sobre a plasticidade sináptica, especialmente os efeitos do GM1 em vários sistemas de neurotransmissores, como o dopaminérgico, o colinérgico, o noradrenérgico e o serotoninérgico (Hadjiconstantinou and Neff, 1998b).

Além disso, Ando e colaboradores (2006) mostraram que os gangliosídeos GM1 e GQ1b são capazes de aumentar o influxo de íons cálcio em sinaptossomas, indicando que os gangliosídeos modulam os processos eletroquímicos de transmissão e, provavelmente, o armazenamento de informações no sistema nervoso central (Rahmann, 1995).

Foi proposto que os gangliosídeos também atuam como inibidores da proteína quinase C (PKC), e impedem a translocação desta enzima do citosol para a membrana. Sendo assim, foi sugerido que os efeitos protetores do GM1 seriam pela inibição da translocação e conseqüente ativação da PKC (Vaccharino et al., 1987; Favaron et al., 1988).

Contudo, apesar das propriedades neuroprotetoras dos gangliosídeos, a concentração que atinge o SNC é baixa, devido à presença da barreira hematoencefálica, somente cerca de 1 a 3% da dose de GM1 administrada sistemicamente atinge o SNC (Orlando et al., 1979; Ghidoni et al., 1989), entretanto é suficiente para exercer propriedades neuroprotetoras. Já os gangliosídeos semi-sintéticos como o LIGA-20 (um análogo do GM1) com atividade neuroprotetora (Wu et al., 2005), atinge concentrações cerebrais maiores e por períodos mais longos (Polo et al., 1994), pois atravessa a barreira hematoencefálica mais eficientemente (Wells et al., 1996). Da mesma forma, quando adicionados a um meio de incubação podem estar na forma de monômeros, oligômeros ou micelas, e sua incorporação a células intactas e preparações de membrana é altamente dependente da concentração do gangliosídeo e do tempo de incubação (Saqr et al., 1993).

#### **1.1.5. Efeitos Neuroprotetores do Gangliosídeo GM1**

Tendo em vista a diversidade de ações dos gangliosídeos, a utilização clínica de gangliosídeos exógenos, especialmente do monossialotetrahexosilgangliosídeo, tem sido proposta para uma grande diversidade de patologias relacionadas ao sistema nervoso: lesão de medula espinhal (Mahadik & Karpiak, 1988; Geisler et al., 1991), neuropatias periféricas (Schneider et al., 1994), doenças cérebro-vasculares (Carolei et al., 1991), isquemia (Lazzaro et al., 1994), hipóxia (Krajnc et al., 1994), doenças de



Parkinson (Schneider, 1998), Alzheimer (Svennerholm et al., 2002) e traumatismo crânio-encefálico (Chen et al., 2003).

Foi proposto que os gangliosídeos normalizam vários processos metabólicos e aumentam a viabilidade de culturas de neurônios expostos a altas concentrações de aminoácidos excitatórios (Favaron et al., 1988; Costa et al., 1993; Lazarewicz et al., 1994). Deste modo, o GM1 atenua a citotoxicidade promovida pelo L-aspartato em cultura de células cerebelares de rato (Skaper et al., 1990), por glutamato e cainato (Favaron et al., 1988) e também por N-metil D-aspartato (NMDA) (Facci et al., 1990). O tratamento com GM1 (30 mg/kg/dia, i.p., por três dias), reduz o aumento de aminoácidos excitatórios no líquido de diálise após uma lesão isquêmica (Lombardi and Moroni, 1992), e atenua a perda neuronal induzida por anóxia (Skaper et al., 1989) e reduz a neurodegeneração induzida por etanol (Saito et al., 2007).

O GM1 também tem sido estudado como um agente anticonvulsivante, uma vez que ele inibe a atividade epileptiforme recorrente em ratos, induzida pela injeção intracerebral de anticorpos contra gangliosídeos cerebrais (Karpiak et al., 1976; Karpiak et al., 1981), atenua as convulsões induzidas por soman (Ballough et al., 1998), ácido metilmalônico (Fighera et al., 2003), ácido glutárico e pentilenotetrazol (Fighera et al., 2006). Entretanto, o GM1 não altera as convulsões induzidas por estimulação elétrica em ratos (Albertson and Walby, 1987), e não está esclarecido se seus efeitos anticonvulsivantes e neuroprotetores estão relacionados com suas propriedades antioxidantes.

Existem vários estudos relacionando os efeitos neuroprotetores do gangliosídeo GM1 com sua ação antioxidante, tanto *in vivo* (Fighera et al., 2003; 2004; 2006), como *in vitro* (Maulik et al., 1993; Avrova et al., 1994; 2002). De fato, o GM1 inibe a lipoperoxidação e protege receptores e enzimas, como a Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase, contra o dano

oxidativo induzido por isquemia (Mahadik et al., 1989) e glutamato (Avrova et al., 2002). Maulik e colaboradores (1993) sugerem que esse glicosfingolípido tenha atividade antioxidante direta, já que é capaz de neutralizar a ação de radicais livres, como os radicais hidroxila e superóxido, induzidos por isquemia em miocárdio de ratos *in vitro*. Tiurin e colaboradores (1992) sugeriram que os gangliosídeos são inibidores da fosfolipase A<sub>2</sub>, responsável pela liberação do ácido araquidônico das membranas para posteriormente ser convertido em prostaglandinas pela ciclooxigenases, gerando assim espécies reativas. Lazarewics e colaboradores (1994) mostraram que a administração de GM1 diminui o conteúdo de prostaglandinas e eicosanóides que se acumulam no cérebro após uma lesão isquêmica.

Estudos anteriores mostram que a administração sistêmica de GM1 (2 injeções de 50 mg/kg, i.p., separadas por um intervalo de 24 horas) diminui as convulsões e a lipoperoxidação induzidas por metilmalonato (Fighera et al., 2003), a lipoperoxidação e carbonilação protéica induzidas por ácido glutárico e pentilenotetrazol (Fighera et al., 2006), bem como aumentam o conteúdo de ácido ascórbico estriatal (Fighera et al., 2003). Interessantemente, essa mesma dose de GM1 aumenta a atividade catalásica cerebral e reduz a quimioluminescência no córtex cerebral *ex vivo*. No entanto, em homogeneizado de córtex *in vitro*, o GM1 reduz a atividade catalásica e não causa efeito significativo sobre a quimioluminescência (Fighera et al., 2003; 2004), mostrando que este gangliosídeo não tem ação antioxidante intrínseca em nosso modelo. Fighera e colaboradores não observaram diferenças na atividade da superóxido dismutase (SOD), da glutationala peroxidase (GPx) e no conteúdo de grupos tióis não-protéicos em homogeneizado de córtex após o tratamento com GM1 (50 mg/kg, i.p.) (Fighera et al., 2004). Entretanto, Mahadik e colaboradores (1993) observaram que a administração de

GM1 (10 mg/kg, i.m.) aumenta os níveis de enzimas antioxidantes, catalase, superóxido dismutase e glutatona peroxidase, após uma lesão isquêmica no córtex.

Além das propriedades neurotróficas, neuroprotetoras, anticonvulsivante e antioxidante, inúmeros trabalhos evidenciam o efeito de melhora da memória induzida por GM1 em diversas tarefas (Silva et al., 1996; Fong et al., 1997; Silva et al., 1999; Silv et al., 2000). Neste sentido, foram apresentadas evidências de que o GM1 se liga a proteína precursora do peptídeo  $\beta$ -amilóide, causando proteólise (Zhang et al., 2007), bem como aumenta a viabilidade das células expostas a este peptídeo (Sokolova et al., 2007), justificando sua utilização em modelos animais e em pacientes com a Doença de Alzheimer (Yanagisawa, 2007).

#### **1.1.6 Síndrome de Guillain-Barré**

Embora o efeito neuroprotetor do gangliosídeo GM1 seja bem conhecido em modelos experimentais e haja evidências de que ele possa ser benéfico para seres humanos (Svennerholm et al., 2002), seu uso é limitado nos Estados Unidos e em alguns países da Europa devido a uma possível relação entre o surgimento da Síndrome de Guillain-Barré e o uso de gangliosídeos.

A síndrome de Guillain-Barré (SGB), ou polirradiculoneurite aguda, é uma doença aguda, auto-imune caracterizada por uma polineuropatia motora, desencadeada por uma infecção, envolvendo o sistema respiratório ou gastrointestinal, que freqüentemente precede o aparecimento de efeitos neurológicos (Kuwabara, 2007). A SGB é dividida em dois grandes subtipos: polineuropatia desmielinizante inflamatória aguda (AIDP) e neuropatia axonal motora aguda (AMAN) (Asbury and McKhann, 1997).

Numerosos casos de SGB ou outras formas de polineuropatia motora aguda têm sido atribuídas a terapia com gangliosídeos. Desde 1985, foram relatados, espontaneamente, na Alemanha, Itália e Espanha, pelo menos 45 casos de SGB associados ao uso de produtos com gangliosídeos combinados para o tratamento de neuropatia periférica e outras desordens neurológicas. Tipicamente, a SGB tem ocorrido quatro semanas após o tratamento com gangliosídeos; embora a recuperação parcial ou completa em alguns pacientes tenha sido evidente, relatam-se casos fatais. Suspeita-se que as reações envolvam um mecanismo imunológico, uma vez que os gangliosídeos são preparados a partir de córtex cerebral bovino (Govoni et al., 1997). Além disso, muitos casos de SGB também foram relacionados à terapia com monossialogangliosídeo puro, que também é extraído de cérebro bovino. A experiência clínica com esta formulação, contudo, é substancialmente menor que com os gangliosídeos combinados. Atualmente, para minimizar estes efeitos o GM1 está sendo obtido de cérebro porcino. Contudo, a correlação entre o uso de gangliosídeos e a ocorrência da SGB é forte, sendo suportadora de uma hipótese de causa/efeito (Lewis, 1994).

Embora se conheçam diversos efeitos neuroprotetores dos gangliosídeos, a capacidade em produzir melhora neurológica e funcional clinicamente significativa e duradoura ainda não foi demonstrada em algumas situações. Estudos mais abrangentes e bem controlados, com períodos adequados de tratamento são necessários para avaliar os seus benefícios em longo prazo. A eficácia incerta e o potencial dos gangliosídeos para induzir complicações neurológicas severas, como a SGB, limitam sua aceitação e a difusão de seu uso. Contudo, são necessárias investigações complementares para se estabelecer uma relação causal definitiva.

### 1.1.7. Circulação Cerebral e GM1

A diversidade de situações nas quais o GM1 promove neuroproteção provavelmente esteja relacionada à considerável variedade de mecanismos de ação e de efeitos farmacológicos promovidos por este glicosfingolípido. Já foram propostas inúmeras vias de sinalização que seriam moduladas pelo GM1, como a interação com fatores neurotróficos e seus receptores (Duchemin et al., 1997, 1998, 2002; Rabin et al., 2002), ativação de uma família de proteínas ativadas por mitógenos (MAPK) (Mo et al., 2005) e a via da fosfoinositídeo-3-quinase/proteína quinase B (PI3K/Akt) (Duchemin et al., 2007), ação antioxidantes *in situ* e *in vivo* (Avrova et al., 1994; Avrova et al., 1998; Fighera et al., 2003; Fighera et al., 2004). Contudo, é possível que este gangliosídeo atue em uma via comum a várias condições/doenças, como por exemplo, a circulação sanguínea cerebral. No entanto, existem poucos estudos na literatura relacionando o efeito da administração de GM1 sobre circulação cerebral. Neste sentido, Tanaka e colaboradores (1986) mostraram que a administração de GM1 (30 mg/kg), 30 minutos após uma lesão isquêmica em gatos, aumenta o fluxo sanguíneo local, e reduz o dano-isquêmico. Chen e colaboradores (2003) também sugeriram que o GM1 melhora o fluxo sanguíneo cerebral após traumatismo crânio-encefálico, reduzindo a hipóxia, a isquemia e peroxidação lipídica causadas pela lesão.

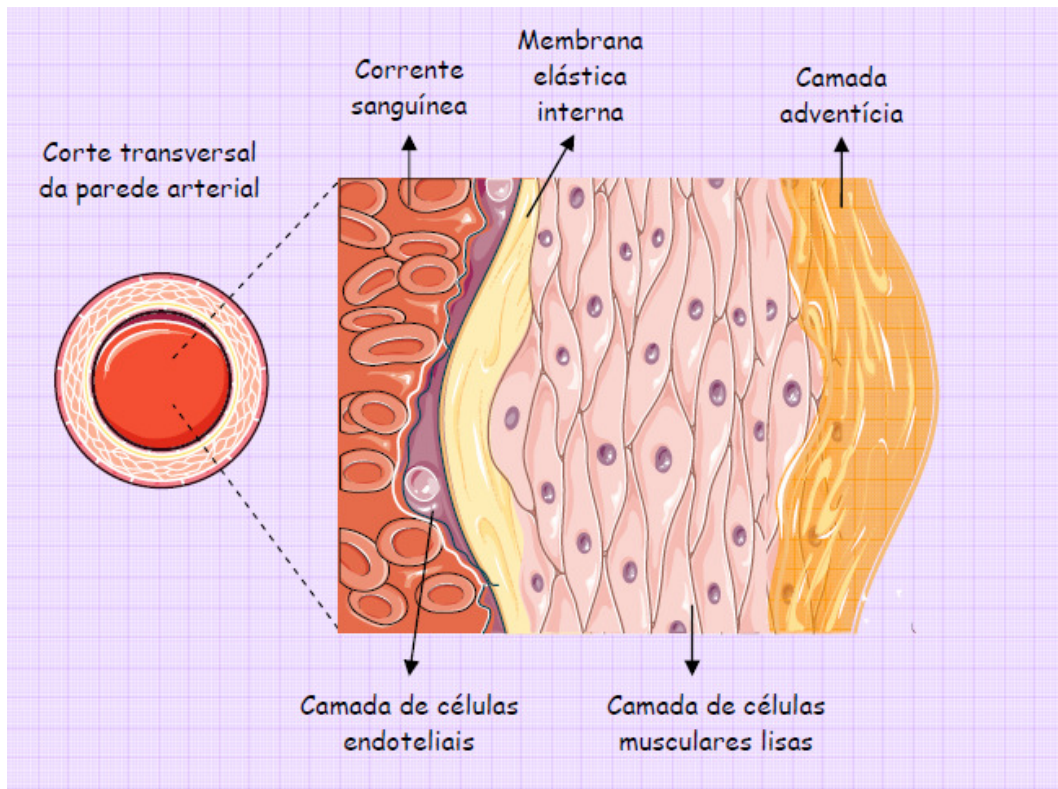
Svennerholm e colaboradores (2002) verificaram o efeito da administração intracerebroventricular de GM1 em pacientes com doença de Alzheimer, por um período de um ano, e observaram uma significativa melhora física e mental dos pacientes, assim como uma tendência de aumento no fluxo sanguíneo cerebral. Estes estudos sugerem um envolvimento do GM1 no aumento do fluxo sanguíneo cerebral.

Na tentativa de estabelecer um possível papel do GM1 sobre a circulação cerebral, um estudo prévio do grupo mostrou que o GM1 aumenta a quantidade de

catalase e assim a atividade da enzima por causar vasodilatação, determinada pelo aumento do diâmetro dos vasos sanguíneos cerebrais e pelo aumento do conteúdo de hemoglobina nas amostras cerebrais (Furian et al., 2007). Estes resultados sugerem que este efeito pode ser o responsável pelas propriedades neuroprotetoras do GM1 em várias condições experimentais. Contudo, nenhum estudo investigou especificamente o mecanismo da ação vasodilatadora induzida pelo GM1. Além disso, a descoberta de substâncias com ação neuroprotetora, antioxidante e vasodilatadora tem despertado o interesse da medicina para o tratamento de diversas patologias relacionadas à formação de radicais livres, lesões no SNC e prejuízos na perfusão tecidual.

## **1.2 Estrutura e funções dos vasos sanguíneos**

O sistema vascular é uma complexa rede de vasos que conecta o coração com diversos órgãos e tecidos para manter sua homeostase em resposta a mudanças fisiológicas e patológicas. Todos os vasos sanguíneos, à exceção dos capilares, são estruturalmente e funcionalmente compostos por três camadas celulares organizadas em torno de um canal central por onde percorre o sangue. Do exterior ao lúmen compreendem a camada adventícia (tecido conjuntivo), a média (tecido muscular liso) e a íntima (células endoteliais) (Opie, 1998) conforme ilustrado na figura 3.



**Figura 3:** Corte transversal da parede arterial enfatizando a camada adventícia, a camada média, constituída por células musculares lisas, e a camada íntima ou endotelial, constituída por uma linha única de células endoteliais.

Fonte: modificado de Servier Medical Art – Powerpoint Image Bank.

A camada adventícia é a mais externa da parede vascular. Sua espessura varia de acordo com o tipo vascular e sua localização. Ela é constituída de tecido conjuntivo denso, composto de fibroblastos e macrófagos residentes, fibras de colágeno, fibras elásticas e terminações nervosas que podem também liberar fatores vasoativos. Os fibroblastos da camada adventícia são capazes de produzir mediadores vasoativos como os ânions superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) (Pagano et al., 1997; Gutterman, 1999; Rey et al., 2002) e até mesmo o óxido nítrico ( $NO^{\bullet}$ ) (Kleschyov et al., 2000).

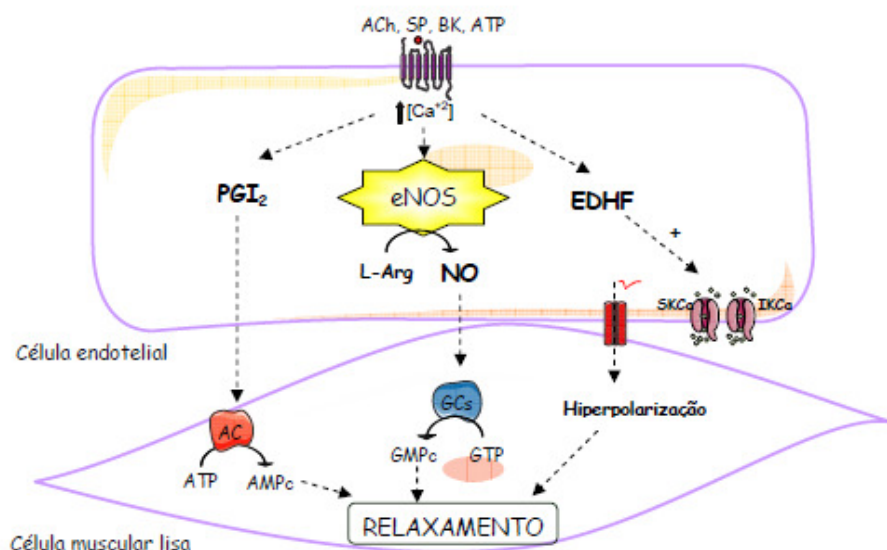
A túnica média, por sua vez contém células musculares lisas dispostas em uma matriz composta por elastina e fibras de colágeno. As células musculares lisas são a sede dos mecanismos de contração e de relaxamento dos vasos. Elas recebem os sinais provenientes do endotélio, e de tecidos adjacentes metabolicamente ativos e das terminações nervosas, os quais estimulam os mecanismos intracelulares nas células musculares lisas que geram a sua contração através do aumento da concentração citosólica do cálcio. O cálcio livre se complexa à calmodulina e ativa a quinase da cadeia leve da miosina (MLCK), a qual fosforila a cadeia leve de miosina (MLC) e permite a interação entre os filamentos de actina e miosina gerando a contração (Walker et al., 1994).

A camada íntima é constituída por uma monocamada de células endoteliais que reveste a superfície interna dos vasos, que separa a luz dos vasos sanguíneos da camada muscular lisa e da camada adventícia (O'Donnell, 2003). Estas células desempenham um papel central no controle da homeostase vascular através da liberação de mediadores potentes que regulam o tônus vascular, a pressão sanguínea e o fluxo sanguíneo através da síntese e secreção de numerosos fatores vasoconstritores e vasodilatadores. Estes fatores são secretados principalmente quando o endotélio é ativado por agonistas que estimulam receptores acoplados a proteínas G e geram um aumento da concentração intracelular do  $Ca^{2+}$  nas células endoteliais. Entre os agonistas estão os neurotransmissores noradrenalina, ATP e substância P; os hormônios circulantes vasopressina, angiotensina II, e insulina; e ainda os autacóides bradicinina, histamina, ADP, endotelina, bem como o produto da coagulação sanguínea, a trombina e, além da serotonina presente nas plaquetas. Alguns destes fatores vasorelaxantes produzidos pelo endotélio estão ilustrados na Figura 4, sendo que a via da prostaciclina ( $PGI_2$ ), a via de produção do óxido nítrico (NO) pela enzima



eNOS, e a via do fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) são as principais vias que medeiam o relaxamento vascular. Após a ligação de agonistas aos seus receptores, ocorre um aumento na concentração de cálcio intracelular e conseqüentemente ativação das vias endoteliais, formação de segundos mensageiros como AMPc e GMPc, ou ainda a hiperpolarização e o relaxamento da célula muscular lisa (Figura 4). Além dos estímulos químicos, existe ainda um importante estímulo físico, o *shear stress*, ou estresse de cisalhamento, o qual corresponde à força que o fluxo sanguíneo exerce nas células endoteliais e que gera a síntese e liberação de mediadores vasorrelaxantes (Matlung et al., 2009). Além disso, a força de cisalhamento, exercida pelo sangue sobre o endotélio vascular, é capaz de induzir uma vasodilatação pelo aumento da secreção do NO, do EDHF e da prostaciclina, além de inibir a secreção da endotelina, um potente fator vasoconstritor (Cohen & Vanhoutte, 1995). O aumento da produção do NO pode ser explicado pelo fato de que o fluxo gera uma rápida ativação da eNOS e, a médio prazo, um aumento da expressão gênica desta enzima por ativação da transcrição da eNOS endotelial (Xiao et al., 1997). A vasodilatação, seja proveniente do estímulo químico (agonista) ou físico (estresse de cisalhamento), é abolida após a remoção do endotélio vascular.

Dentre os vasoconstritores liberados pelo endotélio pode-se destacar a endotelina (Yanagisawa et al., 1988), o tromboxano A<sub>2</sub> (Ellis et al., 1976) e a angiotensina II (Veltmar et al., 1991). Os vasodilatadores liberados são a prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) (Moncada et al., 1976), o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) (Feletou and Vanhoutte, 1988) e o NO (Furchgott, 1983; Ignarro et al., 1987; Palmer et al., 1987; Furchgott and Vanhoutte, 1989) (Figura 4).



**Figura 4:** Fatores vasorrelaxantes produzidos pelo endotélio vascular. São três as principais vias endoteliais que geram a vasodilatação: a via da prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), a via de produção do óxido nítrico (NO) pela enzima eNOS, e a via do fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF). Dependendo do tipo de vaso, todas estas vias podem ser ativadas após a estimulação de receptores das células endoteliais em cuja via de sinalização ocorra o aumento da concentração intracelular do Ca<sup>2+</sup>. Dentre os agonistas pode-se citar a acetilcolina (ACh), substância P (SP), bradicinina (BK), e adenosina trifosfato (ATP). Após a liberação pelas células endoteliais, estes mediadores exercem suas ações nas células musculares lisas, através da produção dos segundo mensageiros AMPc ou GMPc, ou ainda através da hiperpolarização.

### 1.3 Óxido Nítrico (NO)

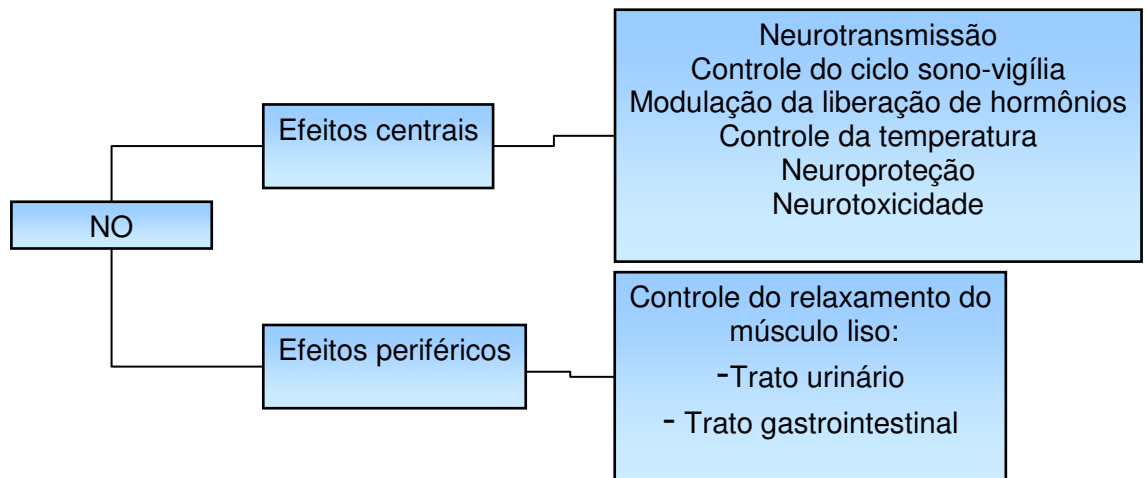
O NO é um gás difusível envolvido em numerosos processos biológicos no sistema cardiovascular, imune e nervoso (Calabrese et al., 2007). Seu papel fisiológico foi proposto em 1980 por Furchgott e Zawadzki, que demonstraram que o relaxamento vascular induzido por acetilcolina era dependente da presença do

endotélio, evidenciando que este efeito era mediado por um fator relaxante de natureza não prostanóide chamado inicialmente (em inglês) de *endothelium derived relaxing factor* ou EDRF. Em 1987 Moncada e Ignarro demonstraram que o EDRF e o NO induziam um relaxamento vascular pelo mesmo mecanismo biológico e apresentam características químicas idênticas (Furchgott and Zawadzki, 1980; Ignarro et al., 1987; Palmer et al., 1987; 1988). Nesse momento, o EDRF foi caracterizado como sendo o NO. Em 1998, devido a importância da descoberta do NO na área médica e científica o Prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina foi conferido a Robert Furchgott, Louis Ignarro e Ferid Murad pelas suas significantes contribuições científicas na área.

Além da importante função como vasodilatador endógeno, o NO também exerce muitas outras funções nos vasos sanguíneos, incluindo a supressão da proliferação das células do músculo liso, modulação da expressão de moléculas de adesão e modulação da ativação de leucócitos, bem como adesão de leucócitos e agregação plaquetária (Huang, 1999). No sistema nervoso periférico, o NO funciona como um neurotransmissor não-adrenérgico e não-colinérgico no trato gastrointestinal, respiratório e genitourinário (De Giorgio et al., 1994).

No SNC a primeira evidência do papel do NO como neurotransmissor foi demonstrada pela liberação de uma molécula difusível, com propriedades semelhantes às produzidas pelo EDRF após a estimulação dos receptores NMDA pelo glutamato (Garthwaite and Boulton, 1995). Atualmente, o papel do NO no SNC está sendo alvo de inúmeros estudos, que evidenciam sua participação em funções cognitivas, plasticidade sináptica, no controle do sono, apetite, temperatura corporal e neurosecreção (Guix et al., 2005; Calabrese et al., 2007). Estudos posteriores mostraram que o NO atua como neurotransmissor no SNC e periférico (Figura 5) por

mecanismos dependentes de guanosina 3',5'- monofosfato cíclico (GMPc) (Arnold et al., 1977).

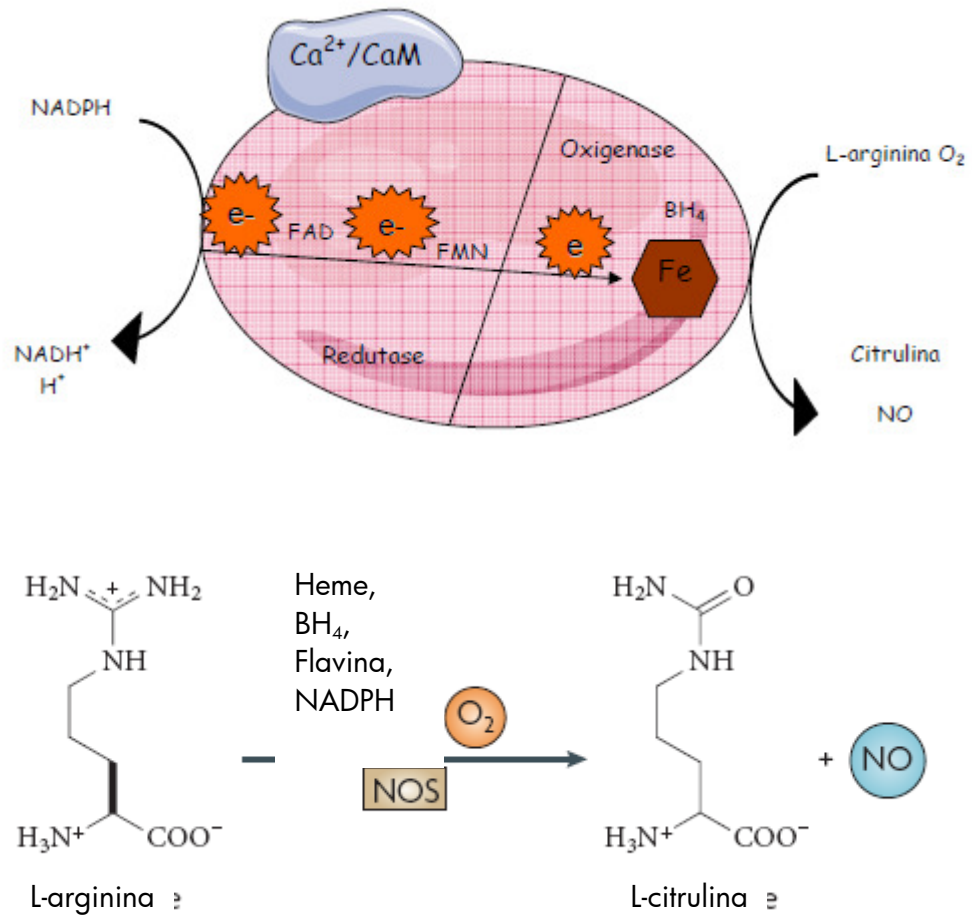


**Figura 5:** Ações do Óxido Nítrico no sistema nervoso Central e Periférico.

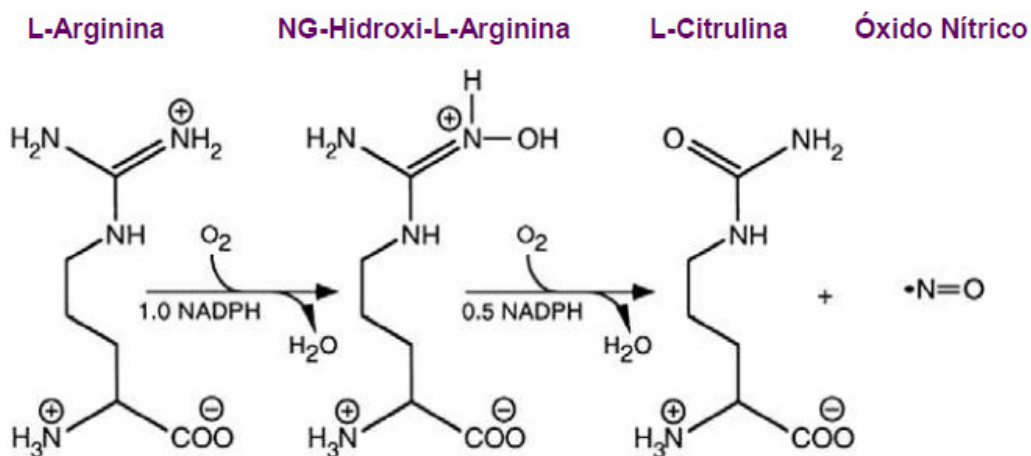
Fonte: Adaptado de Calabrese et al., 2007.

### 1.3.1 Síntese do NO

A produção do NO ocorre por meio de uma reação catalisada pelas enzimas óxido nítrico sintases (NOS, EC 1.14.13.39): neuronal (nNOS ou NOS-I), induzida (iNOS ou NOS-II) ou endotelial (eNOS ou NOS-III). A NOS utiliza como substrato a L-arginina, através de uma reação que ocorre em duas etapas, envolvendo hemo-oxidações, e catalisa a oxidação do nitrogênio guanidino terminal da L-arginina à L-citrulina e NO (Marletta, 1993). Ambos os passos requerem oxigênio molecular, dinucleotídeo nicotinamida adenina fosfato (reduzida) (NADPH) e co-fatores como mononucleotídeo de flavina (FMN), dinucleotídeo de flavina e adenina (FAD), heme, e tetrahydrobiopterina (BH4) (Figuras 6 e 7). Além disso, o  $Ca^{2+}$  é requerido para a ativação das isoformas constitutivas. O NO formado facilmente se difunde pelas células ou pelas membranas celulares, e está envolvido em diversas funções, tanto a nível central como periférico (Calabrese et al., 2007), ilustradas na Figura 5.



**Figura 6:** Estrutura e atividade catalítica da NOS. Os elétrons são fornecidos pelo NADPH no domínio redutase. A proteína comporta vários sítios de ligação para o substrato L-arginina, o heme, o complexo Ca<sup>2+</sup>/CaM (cálcio-calmodulina) e para os cofatores da reação: NADPH (dinucleotídeo nicotinamida adenina fosfato), BH<sub>4</sub> tetra-hidrobiopterina), FAD (dinucleotídeo de flavina e adenina), FMN (mononucleotídeo de flavina). Adaptado de Calabrese et al., 2007 e Stuehr et al., 1991.



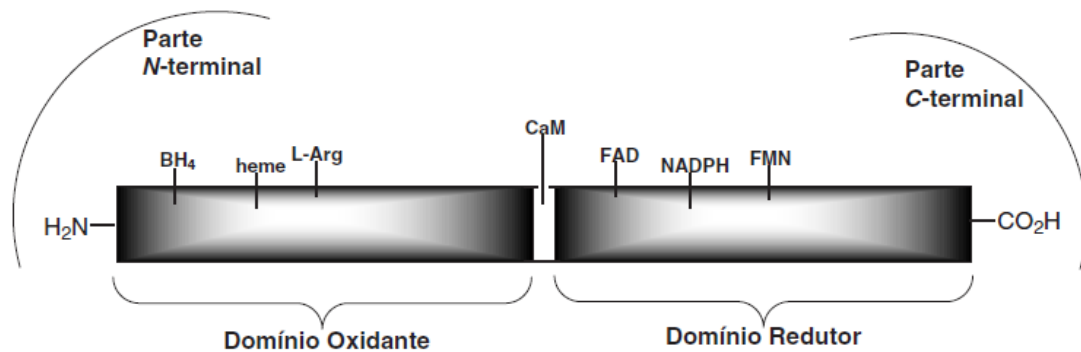
**Figura 7:** Biossíntese do óxido nítrico (NO) em duas etapas, envolvendo heme-oxidações. Fonte: Adaptado de (Stuehr et al., 1991).

### 1.3.2 Isoformas da Óxido Nítrico Sintase

As isoformas da NOS apresentam grande homologia estrutural, cerca de 53% e são codificadas por três genes distintos (Nathan and Xie, 1994). As NOS podem ser divididas em dois domínios, um redutor na porção C-terminal e um oxidante na porção N-terminal. No domínio redutor estão os sítios de ligação para o NADPH e para os co-fatores FMN, FAD, que transferem elétrons para o grupo heme, localizado no domínio oxidante, onde também se ligam o BH<sub>4</sub> e o substrato L-arginina (Abu-Soud and Stuehr, 1993), como ilustrado na figura 6.

Todas as isoformas da NOS são funcionais somente como estruturas diméricas, através da interação entre seus domínios. Além disso, entre estes domínios se localiza o sítio de ligação da ligação do Ca<sup>2+</sup> à calmodulina (CaM), o qual por um mecanismo alostérico é o responsável pelo alinhamento do domínio redutor com o

domínio oxidante, o que permite a transferência de elétrons das flavinas para o grupo heme (Abu-Soud and Stuehr, 1993).



**Figura 8:** Representação dos domínios redutor e oxidante da NOS

Fonte: Barreto e Correia, 2005

A nomenclatura das isoformas da NOS foi dada de acordo com o tecido onde elas foram encontradas primeiramente, embora hoje sabe-se que sua localização é mais ampla e complexa. A nNOS encontra-se principalmente em áreas cerebrais como córtex cerebral, bulbo olfatório, núcleo acumbens, estriado, amígdala, hipocampo (principalmente na região CA1 e no giro denteado), hipotálamo, tálamo, núcleo do trato solitário e no cerebelo (Vincent and Kimura, 1992; Rodrigo et al., 1994). Interessantemente, a expressão da nNOS também foi confirmada em astrócitos e nos vasos sanguíneos cerebrais (Guix et al., 2005). Apesar da expressão predominante no SNC, a nNOS também ocorre em neurônios periféricos não-colinérgicos e não-adrenérgicos que fornecem inervações para o músculo liso do trato gastrointestinal (De Giorgio et al., 1994), bem como no corpo cavernoso do pênis, na uretra e na próstata (Magee et al., 1996).

A isoforma eNOS localiza-se principalmente nas células endoteliais e, exerce papel regulatório do fluxo sanguíneo cerebral (Huang et al., 1995). A eNOs também

foi encontrada em neurônios piramidais da região CA1, CA2 e CA3 do hipocampo, e em células granulares do giro dentado (Oka et al., 2004). Na periferia, a eNOS foi descrita no endotélio sinusóide vascular e no músculo liso do corpo cavernoso (Rajasekaran et al., 1998). A eNOS é a principal isoforma implicada na manutenção das funções vasculares, por isso neste trabalho ela será abordada de uma forma mais ampla. O NO sintetizado pelas eNOS, se difunde rapidamente para as células adjacentes e regula o tônus vascular ao induzir vasodilatação sob influência de diversos estímulos (Furchgott and Zawadzki, 1980).

A expressão da iNOS ocorre em resposta a patógenos, pela sinalização via citocinas como interleucina-1 $\beta$  e interferon- $\delta$  através da atividade do fator nuclear NF- $\kappa$ B (Persichini et al., 2006), principalmente nos macrófagos ativados, nas células da microglia e em astrócitos, recrutados para os locais de infecção e inflamação (Saha and Pahan, 2006), e nas células musculares lisas após a estimulação por agentes próinflamatórios. Portanto, a iNOS é induzida na presença de um processo inflamatório. Diferente da nNOS e da eNOS, a iNOS é regulada em nível transcripcional e sua ativação é independente da concentração intracelular do Ca<sup>2+</sup> (Ghosh & Salerno, 2003). Esta enzima tem como função principal produzir NO em grande quantidade para garantir as atividades antimicrobiana, citostática e imunorregulatória.

Além da localização, as isoformas da NOS também diferem quanto à dependência por cálcio. A eNOS e a nNOS são enzimas constitutivas e dependentes da formação de complexos cálcio-calmodulina para sua ativação, enquanto que a iNOS é induzível e independente de cálcio-calmodulina (Guix et al., 2005).



### 1.3.3 Efeito relaxante do NO

O NO é rapidamente degradado, tendo portanto um meia-vida extremamente curta (3-5 segundos). Entretanto, a maioria dos efeitos mediados pelo NO se devem à ativação da enzima guanilato ciclase solúvel ou citosólica (GCs), pela da ligação do NO ao grupo heme desta enzima (Stone and Marletta, 1995). Esta enzima é responsável pela conversão da guanosina 5'-trifosfato (GTP) em guanosina 3',5'-monofosfato cíclico (GMPC), que é um segundo mensageiro (Ignarro et al., 1987). Este nucleotídeo ativa a proteína quinase G (PKG) que, dentre outras funções defosforila a cadeia leve da miosina tornando-a inativa e provocando o relaxamento (Rapoport et al., 1983; Rapoport and Murad, 1983). Uma segunda via de ação da PKG é a ativação de canais de  $K^+$ , ocasionando hiperpolarização e conseqüente relaxamento vascular (Archer et al., 1994).

Além disso, foi demonstrado que níveis aumentados de GMPC são associados com o relaxamento do músculo liso, neurosecreção e neurotransmissão (Arnold et al., 1977; Krumenacker et al., 2004).



**Figura 9:** Relaxamento do músculo liso vascular via produção de GMPc e ativação da proteína quinase G (PKG).

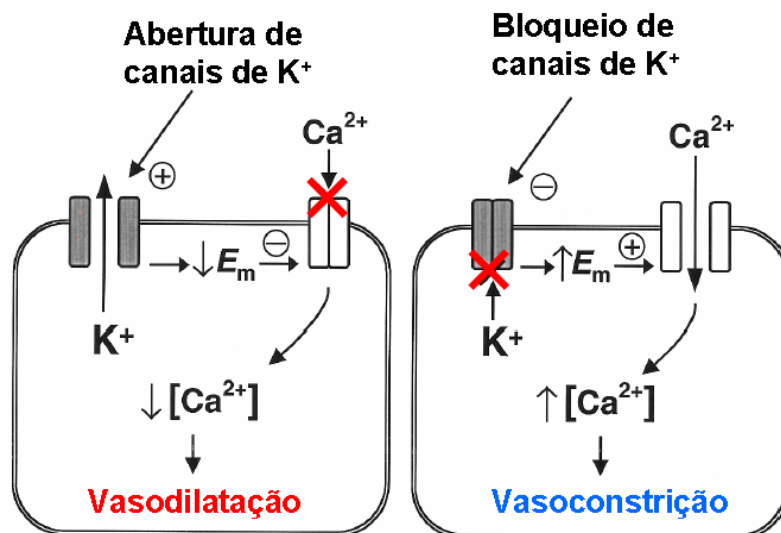
De acordo com o exposto na Figura 9, a ligação de um agonista como a acetilcolina ao seu receptor muscarínico subtipo M3 presente nas células endoteliais, promovem um influxo de cálcio intracelular. O  $Ca^{2+}$  se liga à proteína calmodulina (CaM), formando um complexo cálcio-calmodulina ( $Ca^{2+}$ -CaM), responsável pela estimulação da atividade da NOS, particularmente a eNOS. O NO formado atravessa o espaço do endotélio para o músculo liso vascular, e ativa a enzima guanilato ciclase solúvel (GCs), que catalisa a conversão de GTP em GMPc. O GMPc induz relaxamento do músculo liso por vários mecanismos, que incluem: 1) inibição da entrada de cálcio na célula, reduzindo as concentrações de cálcio intracelular (Pfitzer, 2001), 2) ativação de canais de  $K^+$  causando hiperpolarização e relaxamento (Jackson, 1998), e 3) estimulação da proteína quinase dependente de GMPc (PKG), que ativa a fosfatase da cadeia leve da miosina, que desfosforila a cadeia leve da miosina e produz o relaxamento do músculo liso (Pfitzer, 2001; Munzel et al., 2003).

Após este processo, o GMPc é inativado pela sua hidrólise a guanosina 5'-monofosfato (GMP) catalisada por enzimas da família das fosfodiesterases (Appleman and Terasaki, 1975).

Assim, as propriedades vasorrelaxantes do NO são acompanhadas pela produção do GMPc nas células musculares lisas (Furchgott et al., 1985), responsáveis pela homeostase da pressão arterial e fluxo sanguíneo. Além disso, o efeito vasorrelaxante do NO é inibido na presença da hemoglobina (Hb), um seqüestrador de NO devido ao grupo heme, bem como em presença de inibidores da guanilato ciclase solúvel, como o azul de metileno ou o ODQ (Martin et al., 1985).

#### **1.4 Papel dos Canais de Potássio no controle do tônus vascular**

Os canais de potássio têm importante papel no potencial de membrana das células excitáveis, na regulação da contratilidade muscular e no controle do tônus vascular. Vários estudos mostram que fatores relaxantes derivados do endotélio como NO e PGI<sub>2</sub> induzem vasodilatação por ativação de canais de potássio na membrana celular, permitindo um efluxo de K<sup>+</sup> da célula, redução do potencial de membrana, e hiperpolarização (Nelson and Quayle, 1995). Como consequência, ocorre o fechamento de canais de Ca<sup>2+</sup> dependentes de voltagem na membrana celular e o relaxamento do músculo liso vascular, produzindo a vasodilatação. Entretanto, o fechamento de canais de K<sup>+</sup> por vasoconstritores reduz o efluxo de potássio e promove a abertura de canais de Ca<sup>2+</sup>, aumentando o potencial de membrana, levando a despolarização e conseqüentemente a vasoconstrição (Nelson and Quayle, 1995; Coleman et al., 2004).



**Figura 10:** Ilustração esquemática dos eventos envolvidos na resposta do músculo liso vascular a abertura (esquerda) e bloqueio dos canais de potássio (direita). Fonte: Adaptado de (Sobey, 2001).

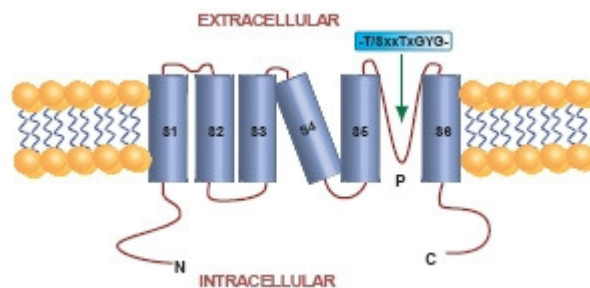
#### 1.4.1 Subtipos de canais de Potássio

Os canais de potássio são uma família de proteínas de membrana, encontradas em vários tipos de células. Nas células endoteliais e nas células do músculo liso vascular já foram identificados quatro tipos de canais de potássio: 1) canais de potássio sensíveis à voltagem ( $K_V$ ); 2) canais de potássio ativados por  $Ca^{2+}$  ( $K_{Ca}$ ), incluindo os de baixa ( $SK_{Ca}$ ), intermediária ( $IK_{Ca}$ ) e alta condutância ( $BK_{Ca}$ ); 3) canais de potássio sensíveis ao ATP ( $K_{ATP}$ ) e; 4) canais de potássio retificadores ( $K_{IR}$ ) (Jackson, 2005; Baranowska et al., 2007).

##### 1.4.1.1 Canais de potássio sensíveis à voltagem ( $K_V$ )

Os canais de potássio dependentes de voltagem ( $K_V$ ) permitem um efluxo de  $K^+$  em resposta a uma despolarização (-35 a -55 mV) da membrana, resultando em

repolarização e retorno ao potencial de repouso. Assim, os  $K_V$  funcionam para limitar a despolarização de membrana e manter o tônus vascular de repouso (Ko et al., 2008). São conhecidos mais de trinta genes que codificam subfamílias das subunidades  $\alpha$  dos  $K_V$ . Sabe-se que as subunidades  $\alpha$  têm domínio citoplasmático N- e C- terminal, e os  $K_V$  são formados por seis domínios transmembranas (S1-S6) que formam um poro (P), sendo que o S4 é o sensor de voltagem (Figura 11). AMPc, NO/GMPc podem ativar os  $K_V$  em alguns vasos sanguíneos, e estes canais são bloqueados pela 4-aminopiridina (Nelson and Quayle, 1995).



**Figura 11:** Representação dos canais de potássio dependentes de voltagem  $K_V$ .

**Fonte:** <http://www.tocris.com/img/targetFiles/potassiumFig1.jpg>

#### 1.4.1.2 Canais de potássio ativados por $Ca^{2+}$ ( $K_{Ca}$ )

Da mesma forma que os canais  $K_V$ , os BKCa são formados por uma subunidade  $\alpha$ , e uma subunidade regulatória  $\beta$ . A subunidade  $\alpha$  (Slo1) é formada por 6 domínios transmembrana (S1-S6), sendo a S4 o sensor de voltagem e a subunidade formadora do poro (Nelson and Quayle, 1995). Além disso, existem 4 isoformas da subunidade  $\beta$  ( $\beta 1$ - $\beta 4$ ), cada uma com 2 domínios transmembrana, que podem estar associados com a subunidade  $\alpha$ , na proporção 1:1 (Tanaka et al., 2004; Ko et al., 2008). A função das

subunidades  $\beta$  é aumentar a sensibilidade do canal aos íons cálcio, sendo a isoforma predominante no músculo liso vascular a  $\beta 1$  (Jiang et al., 1999).

Os canais de potássio ativados por  $\text{Ca}^{2+}$  de alta condutância (BKCa), são abundantes e, o subtipo predominante no músculo liso vascular. São ativados pelo cálcio intracelular e também por despolarização, e contribuem para a manutenção do potencial de membrana nos vasos de pequeno calibre (Jackson, 2005). Um grande número de vasodilatadores, incluindo o NO, CO, e epóxidos do ácido araquidônico, assim como substâncias que aumentam os níveis de AMPc ou GMPc, ativam os BKCa direta, ou indiretamente via ativação de quinases (Archer et al., 1994). Os agentes farmacológicos usados para bloquear estes canais são TEA (~ 200  $\mu\text{M}$ ) (Langton et al., 1991), iberiotoxina e caribdotoxina (10 nM) (Miller et al., 1985).

Alguns vasos do músculo liso também expressam canais de potássio ativados por  $\text{Ca}^{2+}$  de baixa condutância (SKCa). Estes canais requerem a calmodulina para permitir a sensibilidade ao cálcio, e são bloqueados por apamina, um peptídeo extraído do veneno de abelhas (Bond et al., 1999). Sua função no músculo liso vascular ainda não é totalmente conhecida, mas sabe-se que eles são ativados pelo ácido araquidônico (Gauthier et al., 2004).

#### **1.4.1.3 Canais de potássio sensíveis ao ATP ( $\text{K}_{\text{ATP}}$ )**

Os canais de  $\text{K}^+$  sensíveis ao ATP existem na forma de complexos octaméricos, contendo dois tipos de subunidades protéicas. Os canais consistem de quatro subunidades retificadoras ( $\text{K}_{\text{IR}} 6.1$  ou  $\text{K}_{\text{IR}} 6.2$ ) e cada subunidade está associada a um receptor do tipo sulfoniluréia (SUR). A diversidade molecular dos canais  $\text{K}_{\text{ATP}}$  se deve às múltiplas isoformas dos SUR (SUR1, SUR2A, SUR2B, SUR2C), sendo que a

combinação prevalente no músculo liso vascular é a  $K_{IR}$  6.2/SUR2B, seguida por  $K_{IR}$  6.1/SUR2B (Brayden, 2002; Rosenblum, 2003).

Os canais  $K_{ATP}$  são bloqueados por concentrações da ordem micromolar de ATP intracelular, devido à ligação do ATP a subunidade  $K_{IR}$ . Entretanto, nucleotídeos difosfato na presença de  $Mg^{2+}$  podem ativar estes canais por sua ligação a subunidade SUR. Esses canais têm importante papel na vasodilatação mediada por vasodilatadores endógenos como adenosina (Merkel et al., 1992),  $PGI_2$  (Jackson et al., 1993), e pelo peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) (Nelson et al., 1990), além de também estar ativados em situações patológicas como hipóxia (Daut et al., 1990), isquemia (Bari et al., 1998), acidose (Brayden, 2002). A glibenclamida é o bloqueador comumente utilizado para o estudo dos  $K_{ATP}$  em diferentes tecidos (Sobey, 2001).

#### **1.4.1.4 Canais de potássio retificadores ( $K_{IR}$ )**

Estes canais são abundantes no músculo liso dos vasos de resistência de pequeno diâmetro, embora sua função ainda não é completamente conhecida (Ko et al., 2008). Os  $K_{IR}$  são tetrâmeros, sendo que cada subunidade possui 2 domínios transmembrana, que são codificadas por membros da família dos genes  $K_{IR}$ , sendo que a isoforma expressa no músculo liso vascular é a  $K_{IR}$  2.1 (Bradley et al., 1999).

Foram sugeridas duas hipóteses para a provável função destes canais: a) eles contribuem para o potencial de repouso da membrana, visto que ocorre constrição dos vasos coronários e cerebrais na presença de bário, um bloqueador específico dos  $K_{IR}$  (Park et al., 2007) e b) outra evidência indica que ocorre ativação dos  $K_{IR}$  em resposta a aumentos moderados na concentração extracelular de  $K^+$  (10-15mM) causando vasodilatação, visto que a vasodilatação é revertida por  $Ba^{2+}$ , mas não por bloqueadores de outros canais de  $K^+$  (Nelson and Quayle, 1995; Knot et al., 1996).

Nos microvasos coronários e cerebrais, os  $K_{IR}$  atuam como sensores para concentrações aumentadas de  $K^+$ , levando a hiperpolarização e vasodilatação quando as concentrações de  $K^+$  se elevam para valores entre 5 e 15 mM (Edwards et al., 1988; Quayle et al., 1993; Knot et al., 1996). Esses canais são ativados pelo EDHF, pela bradicinina (Rivers et al., 2001) e pelo peptídeo natriurético atrial tipo C (Chauhan et al., 2003).

Enfim, estudos experimentais e clínicos sugerem que o GM1 exerce ações vasomotoras em diversas situações, e este fato tem implicações para as propriedades neuroprotetoras apresentadas por este glicosfingolipídio. De fato, tem sido mostrado que a administração de GM1 (30 mg/kg, i.v.) restaura de maneira significativa a circulação cerebral local e o metabolismo da glicose em animais submetidos ao modelo de isquemia por oclusão arterial (Tanaka et al., 1986). Além disso, o GM1 reduz o edema cerebral e aumenta o metabolismo cerebral após traumatismo crânio-encefálico em ratos (Chen et al., 2003). É importante mencionar que a administração de GM1 promove uma melhora no quadro neurológico e tende a aumentar o fluxo sanguíneo cerebral em pacientes com Mal de Alzheimer (Svennerholm et al., 2002). Neste contexto, nosso grupo recentemente demonstrou que a administração de GM1 (50 mg/kg, i.p.) induz vasodilatação e que este fato está relacionado com um aumento na atividade da enzima antioxidante catalase em hipocampo e córtex cerebral de ratos (Furian et al., 2007), provendo um possível mecanismo convergente para as ações neuroprotetoras do GM1 em várias condições neurodegenerativas, como anóxia (Carolei et al., 1991; Tan et al., 1993), isquemia (Carolei et al., 1991; Kwak et al., 2005) e Mal de Parkinson (Schneider, 1998) e Alzheimer (Yanagisawa, 2007), nas quais existe uma falência no sistema antioxidante cerebral e estresse oxidativo. Entretanto, pouco se sabe



sobre os mecanismos responsáveis pela vasodilatação induzida por GM1, sendo este o objeto de estudo desta tese de doutorado.

O estudo do mecanismo da ação vasodilatadora do gangliosídeo GM1 será realizado através da determinação do diâmetro dos vasos sanguíneos cerebrais, e da determinação do conteúdo de nitratos e nitritos (NOx) em cérebro de ratos, após a administração ou incubação com GM1 e/ou L-NAME. Para investigar a participação da via da GC/GMPc e de canais de potássio neste efeito, serão utilizados anéis de artéria mesentérica isolada de ratos, incubadas com GM1, com inibidores das enzimas e bloqueadores de canais de potássio.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar o mecanismo da ação vasodilatadora induzida pelo gangliosídeo GM1 em cérebro (córtex, hipocampo e vasos piais), e em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Verificar se a administração sistêmica de L-NAME previne o aumento no diâmetro dos vasos sanguíneos cerebrais induzido pelo GM1.

- Verificar o efeito do GM1, ao longo do tempo, sobre a produção de nitratos/nitritos (NOx) em hipocampo e córtex cerebral de ratos *ex vivo*.

- Verificar o efeito da incubação com diferentes concentrações de GM1, ao longo do tempo, sobre a produção de nitratos/nitritos (NOx) e conteúdo de hemoglobina em fatias de córtex cerebral de ratos *in situ*.

- Verificar se o L-NAME reverte o aumento do conteúdo de NOx induzido pelo GM1 em fatias de córtex cerebral de ratos *in situ*.

- Verificar se o GM1 produz relaxamento vascular utilizando uma preparação de anéis de artéria mesentérica isolada.

- Verificar se o relaxamento vascular induzido pelo GM1 depende da presença do endotélio em anéis de artéria mesentérica isolada.

- Verificar a participação do óxido nítrico sintase e da guanilato ciclase no relaxamento vascular induzido pelo GM1 em anéis de artéria mesentérica isolada, utilizando L-NAME como inibidor da NOS e o ODQ como inibidor da GCs.

- Verificar a participação de canais de potássio no relaxamento vascular induzido pelo GM1 em anéis de artéria mesentérica isolada, utilizando bloqueadores de diferentes canais de potássio: tetraetilamônio, glibenclamida, caribdotoxina e apamina.

### **3. RESULTADOS**

Os resultados que fazem parte desta tese estão apresentados sob a forma de artigos científicos. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas, encontram-se nos próprios artigos.

Os artigos estão dispostos da mesma forma que foram publicados na edição das revistas científicas (**Artigo 1**) ou aceito (**Artigo 2**).

### **3.1 Artigo 1**

## **L-NAME PREVENTS THE VASODILATION INDUCED BY GM1 GANGLIOSIDE IN THE BRAIN OF RATS**

FURIAN, A.F., SCHNEIDER, M.O., MAGNI, D.V., SOUZA, M.A.,  
BOTOLUZZI, V.T., BUENO, L.M., ROYES, L.F.F., MELLO, C.F.

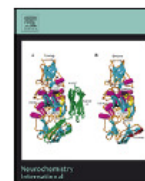
**Neurochemistry International**

**53(6-8):362-369, 2008**



Contents lists available at ScienceDirect

Neurochemistry International

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/neuint](http://www.elsevier.com/locate/neuint)

## L-NAME prevents GM1 ganglioside-induced vasodilation in the rat brain

Ana Flávia Furian<sup>a,b</sup>, Mauro Schneider Oliveira<sup>a,b</sup>, Danieli Valnes Magni<sup>a</sup>, Mauren Assis Souza<sup>a</sup>,  
Vanessa Trindade Bortoluzzi<sup>a</sup>, Livia Maronesi Bueno<sup>a</sup>, Luiz Fernando Freire Royes<sup>a,c</sup>,  
Carlos Fernando Mello<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

<sup>b</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>c</sup>Departamento de Educação Física e Desportos, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 22 July 2008

Accepted 23 July 2008

Available online 12 September 2008

#### Keywords:

GM1 ganglioside

Neuroprotection

Hippocampus

Cortex

L-NAME

Rat

### ABSTRACT

Monosialoganglioside (GM1) is a glycosphingolipid present in most cell membranes that displays antioxidant and neuroprotective properties. It has been recently described that GM1 induces vasodilation. However, the mechanisms underlying GM1-induced vasodilation were not evaluated to date. Therefore, in this study we investigated whether the nonspecific NOS inhibitor L-NAME prevents GM1-induced vasodilation in rats. The systemic injection of GM1 (50 mg/kg, i.p.) increased the outer diameter of pial vessels by 50% in anesthetized animals at 30 min, and this effect was fully prevented by the administration of the nitric oxide synthase inhibitor N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 60 mg/kg, i.p. 15 min before GM1 injection).

A 30 min exposure of cerebral cortex slices to GM1 (100 μM) increased the content of nitrite plus nitrate (NO<sub>x</sub>) by 50%. Addition of L-NAME (100 μM) to the incubation medium fully prevented GM1-induced NO<sub>x</sub> increase. Conversely, a 60 min exposure of slices to GM1 (100 μM) decreased NO<sub>x</sub> content, revealing a biphasic effect of GM1. Our results suggest that NO plays an important role in the vasodilation induced by GM1.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Gangliosides, naturally occurring sialic acid containing glycosphingolipids, are components of most cell membranes. They are particularly abundant in the brain, where they represent the major lipid constituent of the neuronal surface (Ledeen and Yu, 1982; Tettamanti, 2004). Gangliosides are thought to play a modulatory role in different events associated with cell differentiation and oncogenic transformation (Schengrund, 1990; Zeller and Marchase, 1992), adaptive responses (Goettl et al., 2003; Perry et al., 2004), memory formation (Rahmann, 1995; Silva et al., 1996; Fong et al., 1997) and synaptic plasticity (Wieraszko and Seifert, 1985).

Monosialoganglioside (GM1) protects the central nervous system against various neurotoxic agents or conditions, such as aspartic acid (Skaper et al., 1990), MPTP (Rothblat and Schneider, 1994), glutamic acid (Avrova et al., 2000), kainic acid (Wu et al., 2005), methylmalonic acid (Figuera et al., 2003) and glutaric acid exposure (Figuera et al., 2006), apoptosis (Gorria et al., 2006), anoxia (Carolei et al., 1991; Tan et al., 1993) and ischemia (Carolei et al., 1991; Kwak et al., 2005), Parkinson's (Schneider, 1998) and Alzheimer's diseases (Svennerholm, 1994; Yanagisawa, 2007), accompanied by an apparent absence of side effects.

Several neurochemical mechanisms have been proposed for GM1-induced neuroprotection. It has been proposed that GM1 interacts with neurotrophic factors and their receptors *ex vivo* and *in situ* (Duchemin et al., 1997, 1998, 2002; Rabin et al., 2002), activating MAPK (Mo et al., 2005) and PI3-kinase/Akt survival pathways (Duchemin et al., 2007). In addition, there are studies showing that GM1 displays antioxidant action, both *in situ* and *in vivo* (Avrova et al., 1994, 1998), and that systemic GM1 administration increases striatal ascorbic acid content (Figuera et al., 2003) and catalase activity in cerebral cortex homogenates *in vivo* (Figuera et al., 2004).

\* Corresponding author at: Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, Prédio 21, Sala 5219, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil. Tel.: +55 55 3220 9378; fax: +55 55 3220 8241.

E-mail addresses: [cf.mello@smail.ufsm.br](mailto:cf.mello@smail.ufsm.br), [furian.anafavia@gmail.com](mailto:furian.anafavia@gmail.com) (C.F. Mello).

Abbreviations: GM1, monosialoganglioside; aCSF, artificial cerebrospinal fluid; AUC, area under the curve; Hb, hemoglobin; i.p., intraperitoneal; NO<sub>x</sub>, nitrite plus nitrate; L-NAME, N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester.

It has been recently demonstrated that vasodilation underlies the GM1-induced increase of catalase content in brain homogenates, and suggested that this effect could be responsible for the neuroprotection induced by this ganglioside (Furian et al., 2007). In addition, it has been shown that GM1 administration significantly restores local cerebral blood flow and glucose metabolism in animals subjected to middle cerebral artery occlusion (Tanaka et al., 1986), and that GM1 improves neurological status and tends to increase cerebral blood flow in Alzheimer's diseased patients (Svennerholm et al., 2002), further suggesting that vasodilation and better perfusion may underlie the neuroprotection induced by GM1.

Nitric oxide (NO) is involved in several cellular functions, including regulation of blood-vessel tonus, immune and inflammatory response and neurotransmission (Calabrese et al., 2007). NO is a short-lived gas, which is synthesized from L-arginine by the members of the NO synthase (NOS) family of proteins (EC 1.14.13.39) (Calabrese et al., 2007). The NOS family consists of three isoforms: neuronal NOS (nNOS or NOS-1), inducible or macrophage NOS (iNOS or NOS-2) and endothelial NOS (eNOS or NOS-3). NO synthesized in endothelial cells diffuses to smooth muscle cells where it activates soluble guanylate cyclase, resulting in cyclic guanylyl monophosphate-dependent vasodilation (Katsuki et al., 1977; Furchgott and Zawadzki, 1980; Palmer et al., 1987), an important process in the homeostasis of blood pressure and flow. Since NO is a key mediator in vasodilation, and the mechanisms by which GM1 induce vasodilation were not evaluated to date, this study aimed to investigate the involvement of NO-related mechanisms in the vasodilatory action of GM1 (Furian et al., 2007).

## 2. Experimental procedures

### 2.1. Animals and reagents

Adult male Wistar rats (250–280 g), maintained on a 12-h light/dark cycle (lights on at 7:00), with free access to tap water and standard laboratory chow (Guabi, Santa Maria, RS, Brazil) were used. All experimental protocols (including statistical evaluation) were designed aiming to keep the number of animals used to a minimum, as well as their suffering. The Ethics Committee for animal research of the Federal University of Santa Maria approved the experimental design. All reagents were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA) and respective solutions were prepared in type I ultra pure water. GM1 ganglioside was kindly donated by TRB Pharma Laboratories, São Paulo, Brazil.

### 2.2. Outer diameter of cerebral vessels measurement

Animals were deeply anesthetized with Equithesin (1% phenobarbital, 2% magnesium sulfate, 4% chloral hydrate, 42% propylene glycol, 11% ethanol; 3 ml/kg, i.p.) and had their right brain hemisphere exposed by removal of the right parietal bone. Care was taken to leave the dura mater intact, and the cranial window was continuously poured with sterile physiological saline. The animals were then injected with 0.9% NaCl (1 ml/kg, i.p.) or L-NAME (60 mg/kg, i.p.) (Adachi et al., 2000) and 15 min thereafter they were injected with 0.9% NaCl or GM1 (50 mg/kg, i.p.) (Furian et al., 2007). Changes in outer diameter of pial vessels were monitored using a digital video camera coupled to a PZO stereomicroscope (40 $\times$ ), up to 60 min after drug administration, and pial vessels were selected as follows: the optical field was divided in 4 quadrants and 2–3 vessels that had a baseline outer diameter between 5 and 100  $\mu$ m were randomly selected in each quadrant to follow up along time. This resulted in the observation of 8–12 pial vessels/animal along time. The resulting mean of these measurements at each time point (0 and 30 min) was used for posterior statistical analysis. The state of circulation in cerebral vessels was estimated by the change in the outer diameter of pial vessels (Sobey and Quan, 1999) along time, according Podoprigora et al. (2005).

### 2.3. Colorimetric determination of NOx content

For the *ex vivo* experiments, the animals received GM1 (50 mg/kg, i.p.) or saline (0.9% NaCl, 1 ml/kg, i.p.), and 15, 30 or 60 min after the injection, they were sacrificed by decapitation and their brains were rapidly removed. The hippocampi and cerebral cortices were dissected on an inverted ice-cold Petri dish and homogenized with ZnSO<sub>4</sub> (200 mM) and acetonitrile (96%), centrifuged at 16,000  $\times$  g for 30 min at 4  $^{\circ}$ C, and the supernatant was collected for assay of the

nitrite plus nitrate (NOx) content (Miranda et al., 2001). The resulting pellet was suspended in NaOH (6 M) for protein determination. NOx content was estimated in a medium containing 300  $\mu$ l of 2% VCl<sub>3</sub> (in 5% HCl), 200  $\mu$ l of 0.1% N-(1-naphthyl) ethylene-diamine dihydrochloride, 200  $\mu$ l of 2% sulfanilamide (in 5% HCl). After incubating at 37  $^{\circ}$ C for 60 min, nitrite levels were determined spectrophotometrically at 540 nm, based on the reduction of nitrate to nitrite by VCl<sub>3</sub>. Tissue nitrite and nitrate levels were expressed as nmol of NOx/mg of protein.

### 2.4. In situ experiments

Animals were sacrificed by decapitation and the cerebral cortex was immediately dissected and used for the preparation of slices (400  $\mu$ m thick) with a McIlwain tissue chopper. Slices were suspended in a pre-gassed (carbogen) artificial cerebrospinal fluid (aCSF) containing (in mM): 1.25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 22 NaH<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; 1.8 MgSO<sub>4</sub>; 129.0 NaCl; 1.8 CaCl<sub>2</sub>; 3.5 KCl; 10 D-glucose, and pH was adjusted to 7.4 with carbogen, and incubated for 30 min at 37  $^{\circ}$ C with or without GM1 (10, 30 or 100  $\mu$ M). The effect of GM1 (100  $\mu$ M) on NOx content along time was determined at 10, 30 or 60 min. In those experiments designed to evaluate the effect of L-NAME on GM1-induced NOx increase, slices were incubated with aCSF, GM1 (100  $\mu$ M), L-NAME (100  $\mu$ M) or GM1 plus L-NAME for 30 min at 37  $^{\circ}$ C. The concentration of L-NAME was chosen based on a pilot dose-response curve. After incubation, slices were homogenized with ZnSO<sub>4</sub> (200 mM) and acetonitrile (96%). The homogenates were centrifuged at 16,000  $\times$  g for 30 min at 4  $^{\circ}$ C, and the supernatant was collected for determination of NOx content as described above.

### 2.5. Hemoglobin content

The content of hemoglobin in brain and slice homogenates was spectrophotometrically estimated by the absorbance of the Soret band (405–435 nm, multiple wavelength scan), according to Henry (1991) in a Hitachi U-2001 double beam spectrophotometer (Hitachi Instruments Incorporation, Schaumburg, IL, USA). The area under the curve (AUC) of the Soret band was quantified by Autodesk (AutoCAD<sup>®</sup> 2005), corrected for protein content and expressed as AUC/mg of protein as an index of hemoglobin content.

### 2.6. Protein determination

Protein content was measured colorimetrically by the method of Bradford (1976), and bovine serum albumin (1 mg/ml) was used as standard.

### 2.7. Statistical analysis

Variations in the outer diameter of pial vessels induced by GM1 were analyzed by a 2 (NaCl or L-NAME)  $\times$  2 (NaCl or GM1)  $\times$  2 (measures) factorial ANOVA considering the "measures" factor as a within-subject factor. Brain NOx and Hb content *ex vivo* were analyzed by a 2 (NaCl or GM1)  $\times$  3 (times)  $\times$  2 (hippocampus or cortex) factorial ANOVA, with the cerebral structure treated as a within-subject factor. Data from the experiments that evaluated the effect of increasing concentrations of GM1 on NOx and Hb content *in situ* were analyzed by one-way ANOVA. Data from the experiment that assessed the effect of GM1 on NOx content *in situ* were analyzed by a 2 (aCSF or GM1)  $\times$  3 (10, 30 or 60 min) factorial ANOVA. In those experiments involving L-NAME, NOx and hemoglobin content were analyzed by a two-way ANOVA. Post hoc analysis was carried out by the Student–Newman–Keuls test. A  $P < 0.05$  was considered significant. All data are reported as mean  $\pm$  S.E.M.

## 3. Results

In order to investigate whether nitric oxide is involved in the vasodilation induced by GM1, we measured the outer diameter of pial vessels after the systemic injection of GM1 (50 mg/kg, i.p.) or its vehicle, in the presence or absence of L-NAME (60 mg/kg, i.p.) in anesthetized rats (Fig. 1). Baseline diameter of pial vessels was 41.7  $\pm$  0.44  $\mu$ m (range 7.5–95  $\mu$ m, median = 44.6  $\mu$ m). Statistical analysis showed that GM1 increased in 50% the outer diameter of pial vessels compared with baseline at 30 min [two-way ANOVA:  $F(1,16) = 26.87$ ,  $P = 0.001$ , Fig. 2A and B], confirming our previous work (Furian et al., 2007). The administration of NaCl or L-NAME alone did not change the outer diameter of the pial vessels [ $F(1,16) = 0.40$ ,  $P = 0.535$ , data not shown]. However, the administration of L-NAME fully prevented GM1-induced vasodilation [ $F(1,16) = 24.49$ ,  $P = 0.001$ , Fig. 2C and D].

The fact that L-NAME blunted GM1-induced vasodilation *in vivo* suggested the involvement of nitric oxide in such an effect. Since

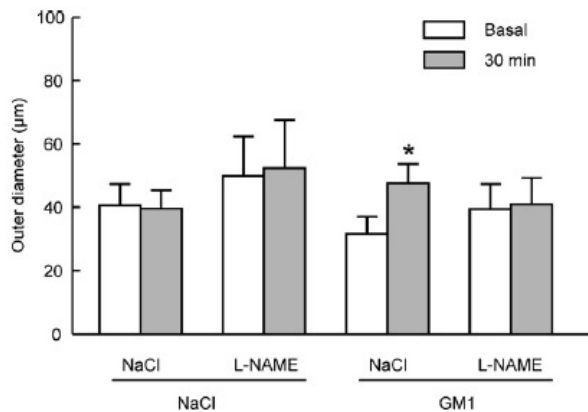


Fig. 1. Effect of NaCl (0.9%), GM1 (50 mg/kg, i.p.), L-NAME (60 mg/kg, i.p.) and L-NAME plus GM1 on the outer diameter of pial vessels (in  $\mu\text{m}$ ) at 30 min. Data are mean  $\pm$  S.E.M. for  $n = 5$  animals in each group, from five different experiments. \*Indicates a significant difference ( $P = 0.001$ ) compared with basal values.

determination of NOx levels has been used to infer variations in NO production (Bryan and Grisham, 2007), we investigated whether GM1 administration increased NOx content *ex vivo* and *in situ*. Fig. 3 shows the effect of systemic injection of GM1 (50 mg/kg, i.p.) 15, 30 or 60 min before sacrifice on the NOx content of the hippocampus (3A) and cerebral cortex (3B). Statistical analysis revealed a significant effect of treatment [ $F(1,42) = 7.28$ ,  $P = 0.010$ ] and a significant effect of time [ $F(2,42) = 4.44$ ,  $P = 0.018$ ] indicating that GM1 decreased NOx content 60 min after administration in hippocampus and in cerebral cortex *ex vivo*. The effect of GM1 on hemoglobin content was also determined. Statistical analyses revealed a significant effect of treatment [ $F(1,42) = 4.74$ ,  $P < 0.05$ ]

and a significant effect of brain structure [ $F(1,42) = 47.26$ ,  $P < 0.001$ , data not shown] on hemoglobin content. Post hoc analysis revealed that GM1 increased hemoglobin content in all cerebral structures, and that cerebral cortex presents the highest hemoglobin content among the studied structures, replicating our previous findings (Furian et al., 2007).

Since it has been demonstrated that NO end products like nitrites and nitrates can be removed from brain *in vivo* by blood flow (Kumura et al., 1994), a possible effect of GM1 on NOx levels *ex vivo* could be masked. Therefore, we decided to investigate the effect of GM1 (0, 10, 30 or 100  $\mu\text{M}$ ) on NOx content in slices of cerebral cortex (Fig. 4A). The slice preparation is devoid of a functional vascular system and, therefore, would be expected to reveal a possible effect of GM1 on NOx levels. Statistical analysis revealed that incubation of slices with GM1 (100  $\mu\text{M}$ ) for 30 min significantly increased NOx levels [ $F(3,24) = 3.74$ ,  $P = 0.024$ ]. As expected, hemoglobin content in cortical slices was not altered by incubation with GM1 [ $F(3,24) = 0.291$ ,  $P = 0.832$ , Fig. 4B]. In addition, we investigated whether GM1 (100  $\mu\text{M}$ ) altered NOx content along time. Statistical analysis revealed a highly significant treatment by time interaction [ $F(2,16) = 12.72$ ,  $P < 0.001$ ]. Post hoc analysis revealed that GM1 increased NOx content in cortical slices at 30 min, but decreased at 60 min (Fig. 5A). As expected, no significant effect of GM1 on hemoglobin content of slices was found along time [ $F(2,16) = 1.90$ ,  $P > 0.05$ , Fig. 5B].

The effect of L-NAME (30, 100 and 300  $\mu\text{M}$ , for 30 min) on NOx and hemoglobin content of cortical slices was also evaluated. Statistical analysis revealed no significant effect of L-NAME *per se* on NOx [ $F(3,12) = 0.295$ ,  $P = 0.829$ , data not shown] or hemoglobin [ $F(3,12) = 0.057$ ,  $P = 0.981$ , data not shown] content.

In order to obtain pharmacological evidence for the role of nitric oxide synthase (NOS) in GM1-induced increase of NOx content *in situ*, cortical slices were incubated with aCSF or L-NAME (100  $\mu\text{M}$ )

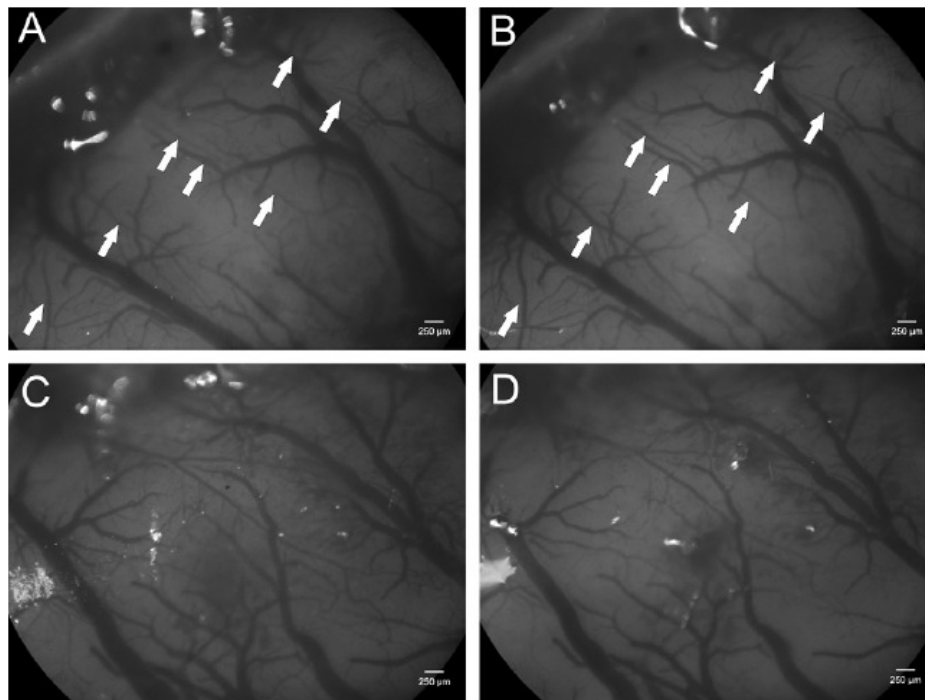


Fig. 2. GM1 increases the outer diameter of pial vessels. (A) and (B) shows representative micrographs of pial vessels before (baseline) and 30 min after the administration of GM1 (50 mg/kg, i.p.), respectively. Arrows indicate vasodilated pial vessels, compared to baseline (40 $\times$ ). (C) and (D) shows representative micrographs of pial vessels before (baseline) and 30 min after the administration of GM1 (50 mg/kg, i.p.) to an animal previously injected with L-NAME (60 mg/kg, i.p., 15 min before GM1), respectively.



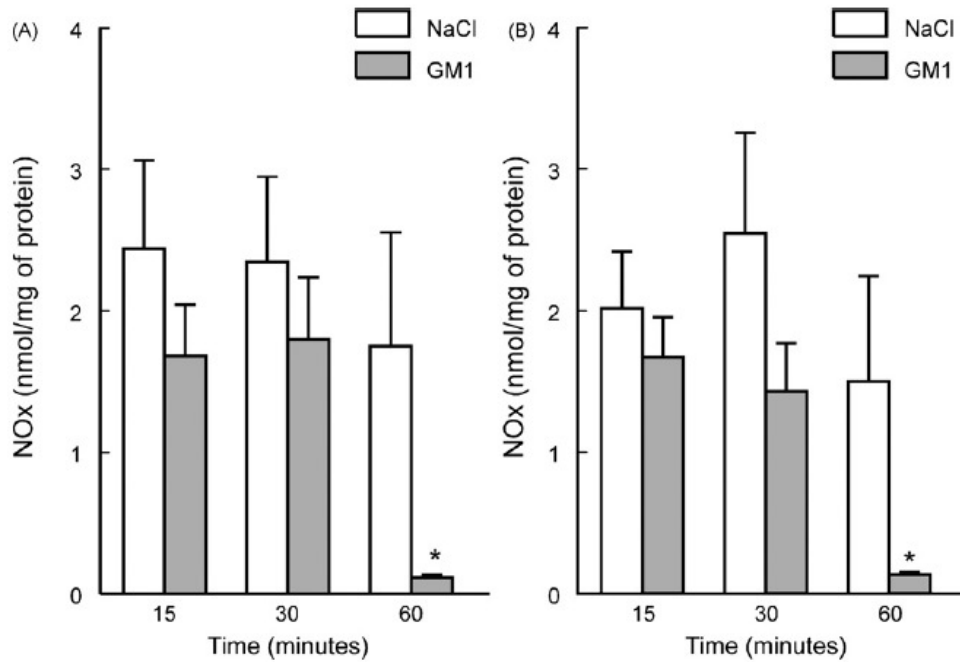


Fig. 3. Effect of GM1 (50 mg/kg, i.p.) injected 15, 30 and 60 min before sacrifice, on NOx content in hippocampus (3A) and cortex (3B) ex vivo. Data are mean + S.E.M. for  $n = 8$  in each group, from five different experiments. \*Indicates a significant difference ( $P = 0.010$ ) compared with the respective NaCl group.

in the presence or absence of GM1 (100  $\mu\text{M}$ ) for 30 min, and the NOx content was measured (Fig. 6A). Statistical analysis revealed a significant NOS inhibitor (aCSF or  $\iota$ -NAME) by glycolipid (GM1 or aCSF) interaction:  $F(1,16) = 18.24$ ,  $P = 0.001$ , because incubation with  $\iota$ -NAME blunted GM1-induced increase of NOx content. As expected, neither the glycolipid nor the NOS inhibitor altered the content of hemoglobin in the slices [ $F(1,16) = 0.43$ ,  $P = 0.524$ , Fig. 6B].

#### 4. Discussion

In the current study we showed that GM1-induced increase of pial vessels outer diameter (50% increase) is fully prevented by NOS inhibitor  $\iota$ -NAME, suggesting that NO underlies the vasodilation induced by GM1 (Figs. 1 and 2). We also showed that GM1 increases NOx content by 50% in cortical slices after a 30 min exposure and decreases NOx content after 60 min (Figs. 4A and

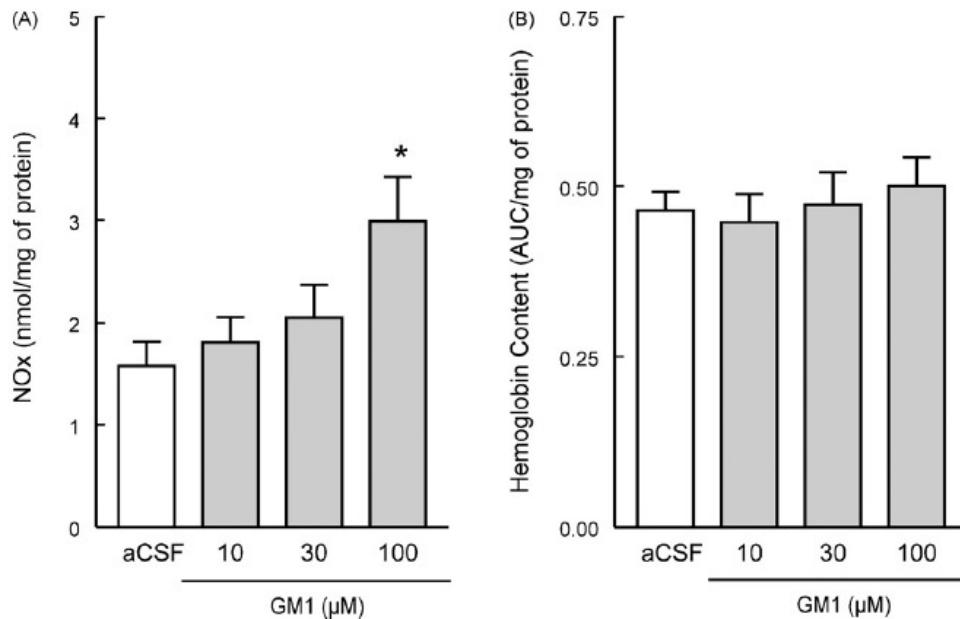


Fig. 4. Effect of GM1 (0, 10, 30 or 100  $\mu\text{M}$ ) on NOx (4A) and hemoglobin content (4B) *in situ*. Data are mean + S.E.M. for  $n = 7$  in each group, from three different experiments. \*Indicates a significant difference ( $P = 0.024$ ) compared with the aCSF group.

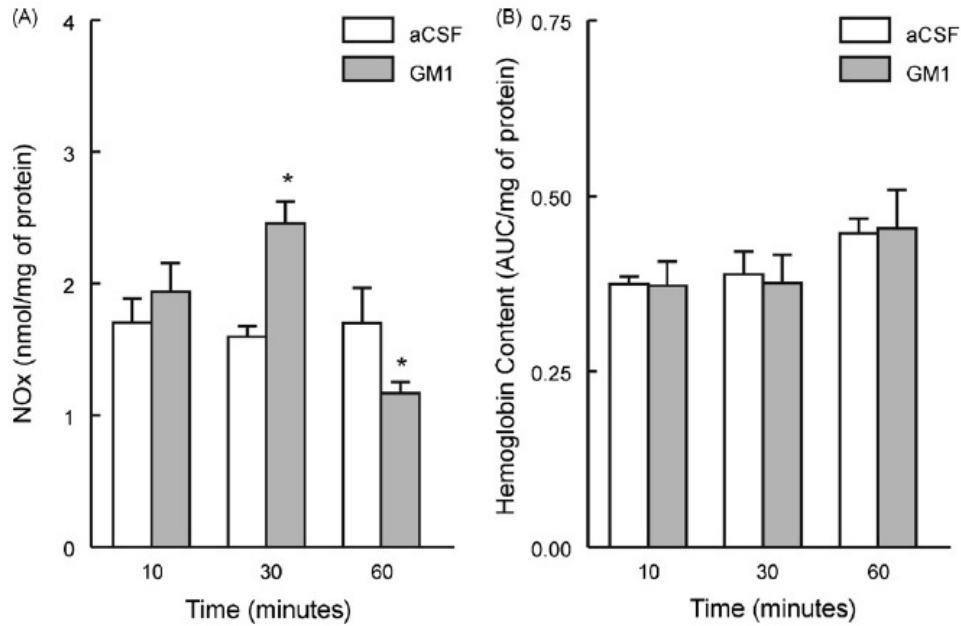


Fig. 5. Effect of GM1 (100  $\mu$ M) exposure for 10, 30 or 60 min on NOx (5A) and hemoglobin content (5B) *in situ*. Data are mean + S.E.M. for  $n = 9$  in each group, from five different experiments. \*Indicates a significant difference ( $P = 0.001$ ) compared with the respective aCSF group.

5A), and that the stimulatory effect of GM1 is fully prevented by L-NAME (Fig. 6A). Interestingly, the systemic administration of GM1 did not modified NOx content *ex vivo* within 30 min (Fig. 3), but caused vasodilation measured by the increase in pial vessels outer diameter (Figs. 1 and 2) and by the increase in hemoglobin content in hippocampal and cortical samples (data not shown).

A number of studies have showed that GM1 exerts vasomotor effects. In fact, it has been shown that GM1 administration (30 mg/kg, *i.v.*) significantly restores local cerebral blood flow and glucose metabolism in animals subjected to arterial occlusion (Tanaka et al., 1986). Moreover, GM1 reduces brain edema and increases

cerebral metabolism after traumatic brain injury (Chen et al., 2003), and improves neurological status and tends to increase cerebral blood flow in Alzheimer's diseased patients (Svennerholm et al., 2002), further suggesting that vasodilation and better perfusion may underlie some pharmacological effects of GM1. In addition, we have recently demonstrated that GM1 induces vasodilation and increases catalase activity in brain samples (Furian et al., 2007), providing a possible convergent mechanism for the neuroprotective actions of GM1 against various neurodegenerative conditions, such as anoxia (Carolei et al., 1991; Tan et al., 1993), ischemia (Carolei et al., 1991; Kwak et al., 2005),

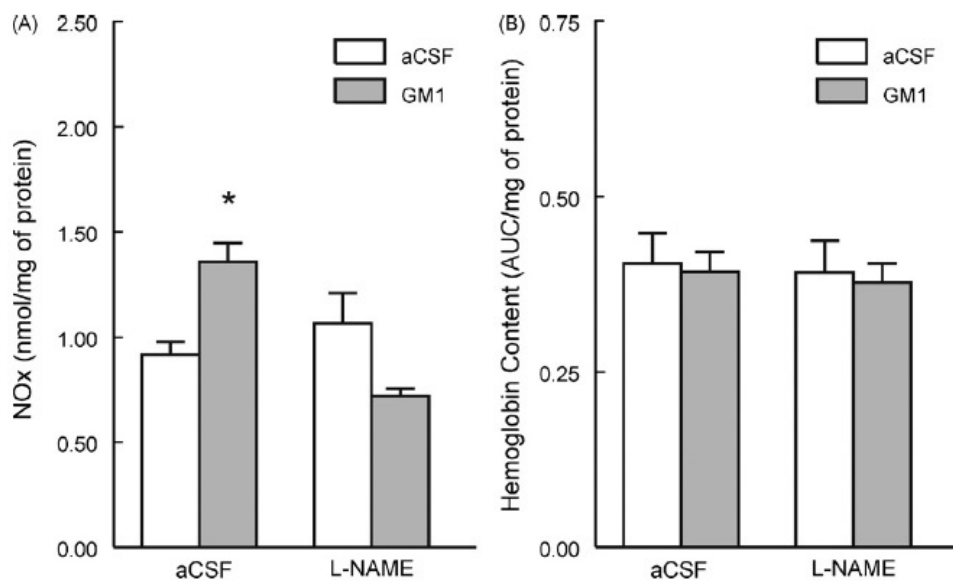


Fig. 6. Effect of L-NAME (100  $\mu$ M) and GM1 (100  $\mu$ M) on NOx (6A) and hemoglobin content (6B) *in situ*. Data are mean + S.E.M. for  $n = 5$  in each group, from three different experiments. \*Indicates a significant difference ( $P = 0.001$ ) compared with the aCSF group.

Parkinson's (Schneider, 1998) and Alzheimer's diseases (Yanagisawa, 2007), in which there is a failure in brain antioxidant system and oxidative stress. However, this is the first study addressing the mechanisms underlying the vasomotor effects of GM1.

In the present study we show that GM1 causes vasodilation and consequently increases brain hemoglobin content through NOS, a key enzyme for vasodilatation control (Palmer et al., 1987), since the effects of GM1 were prevented by the NOS inhibitor L-NAME. Interestingly, it has been shown that GM1 activates Trk C receptors (Duchemin et al., 2002; Rabin et al., 2002), whose activation causes a fourfold increase in nitric oxide production by rat cerebral endothelial cells (Takeo et al., 2003). These findings are in agreement with the currently reported vasodilation induced by GM1, and its reversal by L-NAME. However, one must be aware that the high concentrations of GM1 used in the present study and the time required for the appearing of vasoactive effects of this ganglioside make it unlikely that endogenous GM1 is involved in the physiological regulation of the cerebral vessels tone.

NO is involved in several cellular functions, particularly in the brain, and has been recognized as a critical physiological mediator in the regulation of vascular tone (Vallance et al., 1989; Moncada and Higgs, 1991). NO is synthesized by NOS isoforms, nNOS and eNOS that are constitutively expressed and require the formation of Ca<sup>2+</sup>-calmodulin complexes, and by iNOS, which does not require Ca<sup>2+</sup>-calmodulin complexes formation for its activation (Calabrese et al., 2007). nNOS is abundantly expressed in selected brain areas, such as the cerebral cortex, striatum, amygdala, hippocampus, hypothalamus and thalamus (Vincent and Kimura, 1992; Rodrigo et al., 1994). Interestingly, nNOS has also been found in astrocytes and in the adventitia of rat brain blood vessels (Nozaki et al., 1993), while eNOS is mainly expressed in the endothelium (Marsden et al., 1993). Endothelial NOS has also been found in other cell types, such as human neuronal cells (Oka et al., 2004), human and rat astrocytes (Colasanti et al., 1998) and both have important role in regulating cerebral blood flow (Furchgott and Vanhoutte, 1989; Lee, 2000).

Given its high biological reactivity and diffusibility, NO biosynthesis is controlled by several mechanisms. These encompass modulation of the catalytic reaction, transcription, and post-transcriptional regulation of NOS. Short-term activation, as seen in our study, seems to be mediated by substrate and cofactor availability and phosphorylation (Kavya et al., 2006). Regarding this point, several consensus sequence sites for phosphorylation by protein kinases are found in all three NOS isoforms. For instance, phosphorylation of eNOS by phosphatidylinositol 3-kinase/Akt activates enzyme activity, resulting in increased synthesis of NO (Dimmeler et al., 1998; Fulton et al., 1999). Moreover, the phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors wortmannin and LY-294002 prevent the nNOS-mediated increase in NO content (Canabal et al., 2007), further suggesting that phosphatidylinositol 3-kinase activates NOS. Since it has been demonstrated that GM1 activates phosphatidylinositol 3-kinase at concentrations comparable to that used in our study (Duchemin et al., 2007), it is tempting to propose that GM1 activates NOS through the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. However, this discussion is speculative in nature, and further studies are necessary to determine how GM1 might activate NOS.

It has been shown that L-arginine infusion, a substrate for NO synthesis, increases pial vessels diameter by nitric oxide-dependent mechanism and improves regional cerebral blood flow (rCBF) distal to middle cerebral artery (MCA) occlusion. As a consequence, L-arginine reduces infarction volume in spontaneously hypertensive rats when administered before and after MCA occlusion, further supporting a role for nitric oxide in regulating rCBF (Morikawa et al., 1992, 1994). Interestingly, eNOS knockout mice

present increased neuronal death after a stroke (Huang et al., 1996), which is attenuated by L-arginine. Since L-arginine-induced neuroprotection occurs with concomitant vasodilation, it has been argued that NO derived from other sources than eNOS increases blood flow and underlies such neuroprotection. Based on data from the present study we cannot conclude which NOS isoform is targeted by GM1, and more studies are necessary to determine if the actions of GM1 are due to an effect on a specific NOS isoform.

Since it has been demonstrated that NO end products like nitrites and nitrates can be removed from brain *in vivo* by blood flow (Kumura et al., 1994), a possible effect of GM1 on NOx levels *ex vivo* could be masked. Accordingly, we have not found a GM1-induced increase in NOx content *ex vivo*. However, the experiments in slices of cerebral cortex revealed that GM1 increased NOx production *in situ* at 30 min, in the absence of blood circulation.

It is remarkable that GM1 reduced NOx content in the hippocampus and cerebral cortex (*ex vivo*) and in cortical slices (*in situ*) at 60 min, an effect that temporally coincided with the end of the vasodilatory effect of GM1 *in vivo*. An explanation for this fact come from the fact that nitric oxide accumulation by NOS activity is able to inhibit this enzyme by negative feedback (Assreuy et al., 1993), and thus it is plausible to propose that a significant increase in nitric oxide content 30 min after GM1 administration may result in subsequent inhibition of NOS activity, leading to the currently reported decrease in NOx content 60 min after the administration of GM1. Accordingly, Baumgartner et al. (1997) and Tseng et al. (1998) have shown that GM1 (30 mg/kg, i.v. for 3 days) prevents the increase in cerebral citrullin levels (a coproduct of nitric oxide formed from arginine as a result of nitric oxide synthase activity) in brain of dogs subjected to prolonged circulatory arrest. These results, which indicate a bimodal effect of GM1 on NOS activity determined by the duration of the exposition to the ganglioside, are in agreement with the results from Dawson et al. (1995), who have shown that a 2-h exposure of cells transfected with nNOS to gangliosides (including GM1) inhibits NOS activity (Dawson et al., 1995) and the study of Higashi and Yamagata (1992), who have shown that while low concentrations of gangliosides activate, high concentrations of gangliosides inhibit calmodulin-dependent enzymes. Considering that longer incubations would facilitate GM1 ganglioside incorporation to membranes (Riboni and Tettamanti, 1991) and increase its cellular availability, one might suppose a consequent dual effect on calmodulin binding that could activate or inhibit calmodulin-dependent NOS activity. However, more studies are needed to determine the underlying mechanisms of the currently reported dual effect of GM1 on NOx production *ex vivo* and *in situ*.

In addition, it is interesting to investigate whether GM1 is neuroprotective in other experimental models, such as hyperglycemic cerebral ischemia, since vascular production of superoxide, nitric oxide and peroxynitrite increases in this condition and could contribute for cerebral damage (Bemeur et al., 2007). This is in agreement with the view that NOS inhibitors with antioxidant properties, such as 7NI (Thomas et al., 2008) and GM1, may have a wide spectrum of clinical applications which were not fully considered. Despite the broad neuroprotective properties of exogenous and endogenous gangliosides, particularly GM1, one must be aware that genetic defects that induce ganglioside accumulation are deleterious. Interestingly Baek et al. (2008) have suggested the use of an imino sugar (NB-DGJ) to reduce total brain gangliosides and GM2 content without altering GM1 concentration, in  $\beta$ -hexosaminidase deficient mice.

In summary, in this study we demonstrated that NO plays a role in GM1-induced vasodilation in the brain and that longer exposure to GM1 decreases NO production. These findings further support the use of GM1 ganglioside, or related drugs, to treat clinical

conditions in which vasodilation is associated to a better prognosis, such as obstructive vascular, cardiac insufficiency and neurodegenerative diseases, combining the beneficial effects of early NO-mediated reperfusion with late inhibition of deleterious nitrosative species production.

### Acknowledgements

Research supported by CNPq (grant: 500120/2003-0). Carlos Fernando Mello and Ana Flávia Furian are the recipients of CNPq fellowships. Mauro Schneider Oliveira and Danieli Valnes Magni are the recipients of CAPES fellowships. The authors thank TRB Pharma, the Brazilian representative of Fidia Research Laboratories, for kindly donating GM1 ganglioside.

### References

- Adachi, N., Lei, B., Soutani, M., Arai, T., 2000. Different roles of neuronal and endothelial nitric oxide synthases on ischemic nitric oxide production in gerbil striatum. *Neurosci. Lett.* 288, 151–154.
- Assreuy, J., Cunha, F.Q., Liew, F.Y., Moncada, S., 1993. Feedback inhibition of nitric oxide synthase activity by nitric oxide. *Br. J. Pharmacol.* 108, 833–837.
- Avrova, N.F., Tyurin, V.A., Tyurina, Y., Kagan, V.E., 1994. Gangliosides in postischemic cellular dysfunctions. *Ann. NY Acad. Sci.* 723, 353–355.
- Avrova, N.F., Victorov, I.V., Tyurin, V.A., Zakharova, I.O., Sokolova, T.V., Andreeva, N.A., Stelmaschuk, E.V., Tyurina, Y.Y., Gonchar, V.S., 1998. Inhibition of glutamate-induced intensification of free radical reactions by gangliosides: possible role in their protective effect in rat cerebellar granule cells and brain synaptosomes. *Neurochem. Res.* 23, 945–952.
- Avrova, N.F., Shestak, K.I., Zakharova, I.O., Sokolova, T.V., Tyurina, Y.Y., Tyurin, V.A., 2000. The use of antioxidants to prevent glutamate-induced derangement of calcium ion metabolism in rat cerebral cortex synaptosomes. *Neurosci. Behav. Physiol.* 30, 535–541.
- Baek, R.C., Kasperzyk, J.L., Platt, F.M., Seyfried, T.N., 2008. *N*-Butyldeoxygalacton-jirimycin reduces brain ganglioside and GM2 content in neonatal Sandhoff disease mice. *Neurochem. Int.* 52, 1125–1133.
- Baumgartner, W.A., Redmond, M., Brock, M., Tseng, E., Blue, M.E., Troncoso, J.C., Johnston, M.V., 1997. Pathophysiology of cerebral injury and future management. *J. Card. Surg.* 12, 300–311 (discussion 310–301).
- Bemeur, C., Ste-Marie, L., Montgomery, J., 2007. Increased oxidative stress during hyperglycemic cerebral ischemia. *Neurochem. Int.* 50, 890–904.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Bryan, N.S., Grisham, M.B., 2007. Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. *Free Radic. Biol. Med.* 43, 645–657.
- Calabrese, V., Mancuso, C., Calvani, M., Rizzarelli, E., Butterfield, D.A., Stella, A.M., 2007. Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 766–775.
- Canabal, D.D., Potian, J.G., Duran, R.G., McArdle, J.J., Routh, V.H., 2007. Hyperglycemia impairs glucose and insulin regulation of nitric oxide production in glucose-inhibited neurons in the ventromedial hypothalamus. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 293, R592–R600.
- Carolei, A., Fieschi, C., Bruno, R., Toffano, G., 1991. Monosialoganglioside GM1 in cerebral ischemia. *Cerebrovasc. Brain Metab. Rev.* 3, 134–157.
- Chen, Z.G., Lu, Y.C., Zhu, C., Zhang, G.J., Ding, X.H., Jiang, J.Y., 2003. Effects of ganglioside GM1 on reduction of brain edema and amelioration of cerebral metabolism after traumatic brain injury. *Chin. J. Traumatol.* 6, 23–27.
- Colasanti, M., Persichini, T., Fabrizi, C., Cavalieri, E., Venturini, G., Ascenzi, P., Lauro, G.M., Suzuki, H., 1998. Expression of a NOS-III-like protein in human astroglial cell culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 252, 552–555.
- Dawson, T.M., Hung, K., Dawson, V.L., Steiner, J.P., Snyder, S.H., 1995. Neuroprotective effects of gangliosides may involve inhibition of nitric oxide synthase. *Ann. Neurol.* 37, 115–118.
- Dimmeler, S., Assmus, B., Hermann, C., Haendeler, J., Zeiher, A.M., 1998. Fluid shear stress stimulates phosphorylation of Akt in human endothelial cells: involvement in suppression of apoptosis. *Circ. Res.* 83, 334–341.
- Duchemin, A.M., Neff, N.H., Hadjiconstantinou, M., 1997. GM1 increases the content and mRNA of NGF in the brain of aged rats. *Neuroreport* 8, 3823–3827.
- Duchemin, A.M., Neff, N.H., Hadjiconstantinou, M., 1998. Induction of Trk phosphorylation in rat brain by GM1 ganglioside. *Ann. NY Acad. Sci.* 845, 406.
- Duchemin, A.M., Ren, Q., Mo, L., Neff, N.H., Hadjiconstantinou, M., 2002. GM1 ganglioside induces phosphorylation and activation of Trk and Erk in brain. *J. Neurochem.* 81, 696–707.
- Duchemin, A.M., Ren, Q., Neff, N.H., Hadjiconstantinou, M., 2007. GM1-induced activation of phosphatidylinositol 3-kinase: involvement of Trk receptors. *J. Neurochem.*
- Figuera, M.R., Bonini, J.S., de Oliveira, T.G., Frussa-Filho, R., Rocha, J.B., Dutra-Filho, C.S., Rubin, M.A., Mello, C.F., 2003. GM1 ganglioside attenuates convulsions and thiobarbituric acid reactive substances production induced by the intrastriatal injection of methylmalonic acid. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 35, 465–473.
- 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 Radic. Res.* 38, 495–500.
- Figuera, M.R., Royes, L.F., Furian, A.F., Oliveira, M.S., Fiorenza, N.G., Frussa-Filho, R., Petry, J.C., Coelho, R.C., Mello, C.F., 2006. GM1 ganglioside prevents seizures, Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup>-ATPase activity inhibition and oxidative stress induced by glutaric acid and pentylenetetrazole. *Neurobiol. Dis.* 22, 611–623.
- Fong, T.G., Neff, N.H., Hadjiconstantinou, M., 1997. GM1 ganglioside improves spatial learning and memory of aged rats. *Behav. Brain Res.* 85, 203–211.
- Fulton, D., Gratton, J.P., McCabe, T.J., Fontana, J., Fujio, Y., Walsh, K., Franke, T.F., Papapetropoulos, A., Sessa, W.C., 1999. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* 399, 597–601.
- Furchgott, R.F., Vanhoutte, P.M., 1989. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J.* 3, 2007–2018.
- Furchgott, R.F., Zawadzki, J.V., 1980. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288, 373–376.
- 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 Radic. Biol. Med.* 43, 924–932.
- Goettl, V.M., Zhang, H., Burrows, A.C., Wemlinger, T.A., Neff, N.H., Hadjiconstantinou, M., 2003. GM1 enhances dopaminergic markers in the brain of aged rats. *Exp. Neurol.* 183, 665–672.
- Gornia, M., Huc, L., Sergent, O., Rebillard, A., Gaboriau, F., Dimanche-Boitrel, M.T., Lagadic-Gossman, D., 2006. Protective effect of monosialoganglioside GM1 against chemically induced apoptosis through targeting of mitochondrial function and iron transport. *Biochem. Pharmacol.* 72, 1343–1353.
- Henry, J., 1991. *Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*. W.B. Saunders Co., Philadelphia.
- Higashi, H., Yamagata, T., 1992. Mechanism for ganglioside-mediated modulation of a calmodulin-dependent enzyme. Modulation of calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase activity through binding of gangliosides to calmodulin and the enzyme. *J. Biol. Chem.* 267, 9839–9843.
- Huang, Z., Huang, P.L., Ma, J., Meng, W., Ayata, C., Fishman, M.C., Moskowitz, M.A., 1996. Enlarged infarcts in endothelial nitric oxide synthase knockout mice are attenuated by nitro-L-arginine. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 16, 981–987.
- Katsuki, S., Arnold, W., Mittal, C., Murad, F., 1977. Stimulation of guanylate cyclase by sodium nitroprusside, nitroglycerin and nitric oxide in various tissue preparations and comparison to the effects of sodium azide and hydroxylamine. *J. Cyclic Nucleotide Res.* 3, 23–35.
- Kavya, R., Saluja, R., Singh, S., Dikshit, M., 2006. Nitric oxide synthase regulation and diversity: implications in Parkinson's disease. *Nitric Oxide* 15, 280–294.
- Kumura, E., Kosaka, H., Shiga, T., Yoshimine, T., Hayakawa, T., 1994. Elevation of plasma nitric oxide end products during focal cerebral ischemia and reperfusion in the rat. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 14, 487–491.
- Kwak, D.H., Kim, S.M., Lee, D.H., Kim, J.S., Kim, S.M., Lee, S.U., Jung, K.Y., Seo, B.B., Choo, Y.K., 2005. Differential expression patterns of gangliosides in the ischemic cerebral cortex produced by middle cerebral artery occlusion. *Mol. Cells* 20, 354–360.
- Ledeen, R.W., Yu, R.K., 1982. Gangliosides: structure, isolation, and analysis. *Methods Enzymol.* 83, 139–191.
- Lee, T.J., 2000. Nitric oxide and the cerebral vascular function. *J. Biomed. Sci.* 7, 16–26.
- Marsden, P.A., Heng, H.H., Scherer, S.W., Stewart, R.J., Hall, A.V., Shi, X.M., Tsui, L.C., Schappert, K.T., 1993. Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J. Biol. Chem.* 268, 17478–17488.
- Miranda, K.M., Espey, M.G., Wink, D.A., 2001. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide* 5, 62–71.
- Mo, L., Ren, Q., Duchemin, A.M., Neff, N.H., Hadjiconstantinou, M., 2005. GM1 and ERK signaling in the aged brain. *Brain Res.* 1054, 125–134.
- Moncada, S., Higgs, E.A., 1991. Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. *Eur. J. Clin. Invest.* 21, 361–374.
- Monikawa, E., Rosenblatt, S., Moskowitz, M.A., 1992. L-Arginine dilates rat pial arterioles by nitric oxide-dependent mechanisms and increases blood flow during focal cerebral ischaemia. *Br. J. Pharmacol.* 107, 905–907.
- Monikawa, E., Moskowitz, M.A., Huang, Z., Yoshida, T., Irikura, K., Dalkara, T., 1994. L-Arginine infusion promotes nitric oxide-dependent vasodilation, increases regional cerebral blood flow, and reduces infarction volume in the rat. *Stroke* 25, 429–435.
- Nozaki, K., Moskowitz, M.A., Maynard, K.I., Koketsu, N., Dawson, T.M., Bredt, D.S., Snyder, S.H., 1993. Possible origins and distribution of immunoreactive nitric oxide synthase-containing nerve fibers in cerebral arteries. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 13, 70–79.
- Oka, M., Wada, M., Yamamoto, A., Itoh, Y., Fujita, T., 2004. Functional expression of constitutive nitric oxide synthases regulated by voltage-gated Na<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> channels in cultured human astrocytes. *Glia* 46, 53–62.
- Palmer, R.M., Ferrige, A.G., Moncada, S., 1987. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327, 524–526.
- Perry, J.C., Vital, M.A., Frussa-Filho, R., Tufik, S., Palermo-Neto, J., 2004. Monosialoganglioside (GM1) attenuates the behavioural effects of long-term haloperidol administration in supersensitive rats. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 14, 127–133.
- Podoprigora, G.I., Nartsissov, Y.R., Aleksandrov, P.N., 2005. Effect of glycine on microcirculation in pial vessels of rat brain. *Bull. Exp. Biol. Med.* 139, 675–677.

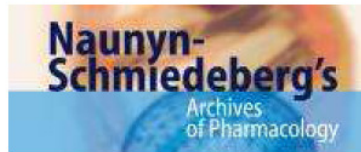
- Rabin, S.J., Bachis, A., Mocchetti, I., 2002. Gangliosides activate Trk receptors by inducing the release of neurotrophins. *J. Biol. Chem.* 277, 49466–49472.
- Rahmann, H., 1995. Brain gangliosides and memory formation. *Behav. Brain Res.* 66, 105–116.
- Riboni, L., Tettamanti, G., 1991. Rapid internalization and intracellular metabolic processing of exogenous ganglioside by cerebellar granule cells differentiated in culture. *J. Neurochem.* 57, 1931–1939.
- Rodrigo, J., Springall, D.R., Uttenthal, O., Bentura, M.L., Abadía-Molina, F., Riveros-Moreno, V., Martínez-Murillo, R., Polak, J.M., Moncada, S., 1994. Localization of nitric oxide synthase in the adult rat brain. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 345, 175–221.
- Rothblat, D.S., Schneider, J.S., 1994. Spontaneous functional recovery from Parkinsonism is not due to reinnervation of the dorsal striatum by residual dopaminergic neurons. *Brain Res. Bull.* 34, 309–312.
- Schengrund, C.L., 1990. The role(s) of gangliosides in neural differentiation and repair: a perspective. *Brain Res. Bull.* 24, 131–141.
- Schneider, J.S., 1998. GM1 ganglioside in the treatment of Parkinson's disease. *Ann. NY Acad. Sci.* 845, 363–373.
- 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. *Neurobiol. Aging* 17, 583–586.
- Skaper, S.D., Facci, L., Leon, A., 1990. Gangliosides attenuate the delayed neurotoxicity of aspartic acid in vitro. *Neurosci. Lett.* 117, 154–159.
- Sobey, C.G., Quan, L., 1999. Impaired cerebral vasodilator responses to NO and PDE V inhibition after subarachnoid hemorrhage. *Am. J. Physiol.* 277, H1718–1724.
- Svennerholm, L., 1994. Gangliosides—a new therapeutic agent against stroke and Alzheimer's disease. *Life Sci.* 55, 2125–2134.
- Svennerholm, L., Brane, G., Karlsson, I., Lekman, A., Ramstrom, I., Wikkelso, C., 2002. Alzheimer disease—effect of continuous intracerebroventricular treatment with GM1 ganglioside and a systematic activation programme. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 14, 128–136.
- Takeo, C., Nakamura, S., Tanaka, T., Uchida, D., Noguchi, Y., Nagao, T., Saito, Y., Tatsuno, I., 2003. Rat cerebral endothelial cells express trk C and are regulated by neurotrophin-3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 305, 400–406.
- Tan, W.K., Williams, C.E., Gunn, A.J., Mallard, E.C., Gluckman, P.D., 1993. Pretreatment with monosialoganglioside GM1 protects the brain of fetal sheep against hypoxic-ischemic injury without causing systemic compromise. *Pediatr Res.* 34, 18–22.
- Tanaka, K., Dora, E., Urbanics, R., Greenberg, J.H., Toffano, G., Reivich, M., 1986. Effect of the ganglioside GM1, on cerebral metabolism, microcirculation, recovery kinetics of ECoG and histology, during the recovery period following focal ischemia in cats. *Stroke* 17, 1170–1178.
- Tettamanti, G., 2004. Ganglioside/glycosphingolipid turnover: new concepts. *Glycoconj. J.* 20, 301–317.
- Thomas, B., Saravanan, K.S., Mohanakumar, K.P., 2008. In vitro and in vivo evidences that antioxidant action contributes to the neuroprotective effects of the neuronal nitric oxide synthase and monoamine oxidase-B inhibitor, 7-nitroindazole. *Neurochem. Int.* 52, 990–1001.
- Tseng, E.E., Brock, M.V., Lange, M.S., Troncoso, J.C., Blue, M.E., Lowenstein, C.J., Johnston, M.V., Baumgartner, W.A., 1998. Monosialoganglioside GM1 inhibits neurotoxicity after hypothermic circulatory arrest. *Surgery* 124, 298–306.
- Vallance, P., Collier, J., Moncada, S., 1989. Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man. *Lancet* 2, 997–1000.
- Vincent, S.R., Kimura, H., 1992. Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. *Neuroscience* 46, 755–784.
- Wieraszko, A., Seifert, W., 1985. The role of monosialoganglioside GM1 in the synaptic plasticity: in vitro study on rat hippocampal slices. *Brain Res.* 345, 159–164.
- Wu, G., Lu, Z.H., Wang, J., Wang, Y., Xie, X., Meyenhofer, M.F., Ledeen, R.W., 2005. Enhanced susceptibility to kainate-induced seizures, neuronal apoptosis, and death in mice lacking ganglioside GM1: protection with LIGA, 20 a membrane-permeant analog of GM1. *J. Neurosci.* 25, 11014–11022.
- Yanagisawa, K., 2007. Role of gangliosides in Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1768, 1943–1951.
- Zeller, C.B., Marchase, R.B., 1992. Gangliosides as modulators of cell function. *Am. J. Physiol.* 262, C1341–1355.

## **3.2 Artigo 2**

### **NITRIC OXIDE AND POTASSIUM CHANNELS MEDIATE GM1 GANGLIOSIDE-INDUCED VASORELAXATION**

FURIAN, A.F., RATTMANN, Y.D., SCHNEIDER, M.O.,  
ROYES, L.F.F., MARQUES, M.C.A., SANTOS, A.R.S., MELLO, C.F.

*Aceito na Revista Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology.*



**Nitric oxide and potassium channels mediate GM1 ganglioside-induced vasorelaxation**

Journal:	<i>Naunyn-Schmiedeberg Archives of Pharmacology</i>
Manuscript ID:	Naunyn-00042-2009.R1
Manuscript Type:	Original
Keywords:	mesenteric artery, potassium channel, nitric oxide, guanylate cyclase, endothelium



Review

**Nitric oxide and potassium channels  
mediate GM1 ganglioside-induced vasorelaxation**

Ana Flávia Furian<sup>a,b</sup>, Yanna Dantas Rattmann<sup>c</sup>, Mauro Schneider Oliveira<sup>a,b</sup>,  
Luiz Fernando Freire Royes<sup>a,d</sup>, Maria Consuelo Andrade Marques<sup>c</sup>,  
Adair Roberto Soares Santos<sup>c</sup>, Carlos Fernando Mello<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria,  
97105-900 Santa Maria, RS, Brasil

<sup>b</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Universidade  
Federal do Rio Grande do Sul, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brasil

<sup>c</sup> Departamento de Farmacologia, Centro Politécnico, Universidade Federal do  
Paraná, 81531-970 Curitiba, PR, Brasil

<sup>d</sup> Departamento de Métodos e Técnicas Desportivas, Universidade Federal de Santa  
Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brasil

<sup>e</sup> Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de Santa Catarina,  
Campus Universitário Trindade, 88040-900 Florianópolis, SC, Brasil

\*Corresponding author: Dr. Carlos Fernando Mello  
Departamento de Fisiologia e Farmacologia,  
Universidade Federal de Santa Maria  
97105-900 Santa Maria, RS, BRASIL.  
FONE: +55 55 3220 9378  
FAX: +55 55 3220 8241  
e-mail: [cf.mello@smail.ufsm.br](mailto:cf.mello@smail.ufsm.br)



## **Abstract**

Monosialotetra-hexosylganglioside (GM1) is a glycosphingolipid present in most cell membranes that displays antioxidant and neuroprotective properties. It has been recently described that GM1 induces pial vessel vasodilation and increases NO<sub>x</sub> content in cerebral cortex, which are fully prevented by the nitric oxide synthase inhibitor L-NAME. However, it is not known whether GM1 relaxes larger vessels, as well as the mechanisms by which GM1 causes vasorelaxation.

In this study we demonstrate that GM1 (10, 30, 100, 300 μM, 1 and 3 mM) induces vascular relaxation determined by isometric tension studies in rat mesenteric artery rings contracted with 1 μM phenylephrine. The vasorelaxation induced by GM1 was abolished by endothelium removal, by incubation with L-NAME (1 μM) and partially inhibited by the blockade of potassium channels by 1 mM tetraethylammonium, 10 μM glibenclamide, by the soluble guanylate cyclase inhibitor 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3- $\alpha$ ]quinoxalin-1-one (10 μM), and by 50 nM charybdotoxin, a blocker of large and intermediate conductance calcium-activated potassium channels. Moreover, GM1-induced relaxation was not affected by apamin (50 nM), a small conductance calcium-activated potassium channel blocker.

The results indicate that direct and indirect nitric oxide pathways play a pivotal role in vasorelaxation induced by GM1, which is mediated mainly by potassium channels activation. We suggest that vasodilation may underlie some of the biological effects of exogenous GM1 ganglioside.

*Key-words:* mesenteric artery; potassium channel; nitric oxide; guanylate cyclase, endothelium

*Abbreviations:* ACh, acetylcholine; ANOVA, analysis of variance, cGMP, cyclic guanosine monophosphate; (+E), endothelium intact; (-E), endothelium denuded; eNOS, endothelial nitric oxide synthase; GLB, glibenclamide; GM1, monosialotetrahexosylganglioside;  $K_{ATP}$ , ATP-sensitive potassium channel;  $K_{Ca}$ , calcium-activated potassium channel;  $K_V$ , voltage-sensitive potassium channel; L-NAME,  $N^G$ -nitro-1-arginine methyl ester; NO, nitric oxide; NOS: nitric oxide synthase; ODQ, 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3- $\alpha$ ]quinoxalin-1-one; Phe, phenylephrine; sGC, guanylate cyclase soluble; TEA, tetraethylammonium; ChTX, charybdotoxin.

## **Introduction**

Gangliosides constitute a heterogeneous family of sialic acid-containing glycosphingolipids that are components of most cell membranes. They are particularly abundant in the brain, where they represent the major lipid constituent of the neuronal surface (Ledeen & Yu 1982; Tettamanti 2004). Administration of GM1 has been reported to protect the central nervous system against various neurotoxic agents or conditions, such as methylmalonic acid (Fighera et al. 2003), pentylenetetrazol and glutaric acid exposure (Fighera et al. 2006), anoxia (Carolei et al. 1991; Tan et al. 1993) and ischemia (Carolei et al. 1991; Kwak et al. 2005), lead-induced neurotoxicity (She et al. 2009), Parkinson's (Schneider 1998) and Alzheimer's diseases (Svennerholm 1994; Yanagisawa 2007), traumatic brain injury (Chen et al., 2003), spinal cord injury (Geisler et al, 2001) accompanied by an apparent absence of side effects in animals. However, caution is warranted because of reports of sporadic cases of Guillain-Barré syndrome after ganglioside therapy (Yuki 1998; Govoni et al. 2003; Komagamine and Yuki 2006).

Several neurochemical mechanisms have been proposed for GM1-induced neuroprotection. It has been proposed that GM1 interacts with neurotrophic factors and their receptors *in vivo* and *in situ* (Duchemin et al. 1997, 1998, 2002; Rabin et al. 2002), activating MAPK (Duchemin et al. 2002; Mo et al. 2005) and PI3-kinase/Akt survival pathways (Duchemin et al. 2008). In addition, there are studies showing that GM1 presents antioxidant activity, both *in situ* and *in vivo* (Avrova et al. 1994, 1998), and that its systemic administration increases the striatal ascorbic acid content (Fighera et al. 2003) and catalase activity in homogenates of the cerebral cortex (Fighera et al. 2004). In fact, it has been demonstrated that vasodilation underlies the GM1-induced increase

of catalase content in the brain and may be responsible, at least in part, for the neuroprotection induced by this ganglioside (Furian et al. 2007).

Nitric oxide (NO) is a short-lived gas, involved in several cellular functions, particularly in the brain, and has been recognized as a critical physiological mediator in the regulation of the vascular tone (Moncada & Higgs 1991). NO is synthesized from L-arginine by the members of the nitric oxide synthase (NOS) family of proteins endothelial (eNOS), neuronal (nNOS) and inducible (iNOS) (Calabrese et al. 2007). NO synthesized in endothelial cells diffuses to smooth muscle cells where it activates soluble guanylate cyclase (Dudzinski & Michel 2007), resulting in cyclic guanylate monophosphate-dependent vasodilation (Furchgott & Zawadzki 1980; Katsuki et al. 1977; Palmer et al. 1987) an important process in the homeostasis of blood flow. Cyclic GMP (cGMP) causes hyperpolarization by activating  $K^+$  channels, resulting in smooth muscle relaxation (Jackson 1998). In addition, it has also been reported that NO causes direct activation of  $K^+$  channels in smooth muscle cells, causing vasodilation (Bolotina et al. 1994). In summary, accumulating evidence suggests that NO regulates blood vessel tonus through direct or indirect activation of  $K^+$  channels, but the role of these channels on GM1-induced vasodilation is unknown. Therefore, since (1) GM1 increases NO content, (2) L-NAME prevents GM1-induced vasodilation (Furian et al. 2008) and (3) sGC and  $K^+$  channels play a key role in the NO-mediated regulation of blood vessel tonus, we hypothesized that these downstream effectors of nitric oxide pathways (guanylate cyclase and  $K^+$  channels) are involved in GM1-induced vasorelaxation.

## **Experimental procedures**

### *Animals*

Adult male Wistar rats (250–280 g), maintained on a 12-h light/dark cycle, and with free access to tap water and standard laboratory chow (Nuvital<sup>®</sup>, Brazil) were used. All experimental protocols (including statistical evaluation) were designed aiming to keep the number of animals used to a minimum, as well as their suffering. The investigation conforms to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996). The Institutional Ethics Committee of the Federal University of Paraná approved all procedures adopted in this study.

### *Drugs*

Phenylephrine hydrochloride, acetylcholine chloride, NG-nitro-L-arginine-methyl-ester (L-NAME), 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3- $\alpha$ ]quinoxalin-1-one (ODQ), tetraethylammonium (TEA), glibenclamide (GLB), apamin and charybdotoxin (ChTX) were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). GLB was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO). All other reagents were of the highest grade and solutions were prepared in fresh type I ultra pure water. GM1 ganglioside was kindly donated by TRB Pharma Laboratories, São Paulo, Brazil.

### *Preparation of rat mesenteric rings*

The rat superior mesenteric artery was identified and mesenteric rings were prepared. Briefly, segments of the mesenteric artery were excised, cleaned of adhering tissue, cut into 2-mm long rings and transferred to a dish filled with Krebs–Henseleit buffer (pH 7.4; composition in mM: NaCl 115.3, KCl 4.9, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 1.46, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

1.2, MgSO<sub>4</sub> 1.2, D-glucose 11.1, NaHCO<sub>3</sub> 25). The rings were suspended in organ baths containing the physiological solution bubbled with carbogen (5% CO<sub>2</sub>/95% O<sub>2</sub>) at 37°C. Isometric force transducers (Leticia Scientific Instruments, Barcelone, Spain) coupled to a MacLab<sup>®</sup> recording system and its application program (Chart, v 3.3) from ADInstruments (Castle Hill, Australia) were used to record contractions and relaxations. Preparations were maintained at a basal tension of 5 mN and allowed to stabilize for 1 h before drugs were added, and during this time the solution was changed every 15 min. In some experiments, endothelium was removed by gently rubbing inside the vessel with a small wire. The integrity of the endothelial layer was verified by the ability of acetylcholine (ACh, 1 μM) to fully relax vessels pre-contracted with phenylephrine (Phe, 1 μM) (Rattmann et al. 2009).

#### *Measurement of vascular relaxation*

The ability of cumulative concentrations of GM1 (10, 30, 100, 300 nM, 1, 3, 10, 30, 100, 300 μM, 1 and 3 mM) to relax endothelium-intact and endothelium-denuded mesenteric rings under sustained contraction elicited with Phe (1 μM) was determined. Only intact endothelium mesenteric rings were used in the experiments designed to evaluate the involvement of K<sup>+</sup> channels, NOS and sGC in the vasorelaxing effect of GM1.

Mesenteric rings were subjected to a 15 min-incubation with L-NAME (1 μM, a non-selective nitric oxide synthase inhibitor), or ODQ (10 μM, a soluble guanylate cyclase inhibitor), or TEA (1 mM; a non-selective K<sup>+</sup> channel blocker), or GLB (10 μM; an ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel blocker), or apamin (50 nM; a small conductance calcium-activated K<sup>+</sup> channel blocker), or ChTX (50 nM; a large and intermediate-conductance calcium-activated K<sup>+</sup> channel blocker) and contracted with Phe (1 μM).

After sustained contraction elicited by Phe to the incubation medium, GM1 (10, 30, 100, 300 nM, 1, 3, 10, 30, 100, 300  $\mu$ M, 1 and 3 mM) was added and the relaxation response measured, as described in *Preparation of rat mesenteric rings*. EC50 values were calculated with GraphPad Prism 4.0 software, by using a non-linear regression, which employ a sigmoidal logarithmic function to estimate the plateau.

### *Statistical analysis*

Variations in the tension of mesenteric rings induced by GM1 were analyzed by a 2 way-ANOVA, with the concentrations treated as a within-subject factor. *Post hoc* analysis was carried out by the Student-Newman-Keuls test. A probability of  $P < 0.05$  was considered significant. All data are reported as mean  $\pm$  S.E.M.

## **Results**

Figure 1 shows the effect of increasing cumulative concentrations of GM1 (10, 30, 100, 300 nM, 1, 3, 10, 30, 100, 300  $\mu$ M, 1 and 3 mM) on the tonus of endothelium-intact (+E), and in endothelium-denuded (-E) mesenteric rings contracted with Phe (1  $\mu$ M). GM1 induced vascular relaxation only in endothelium-intact rings ( $P < 0.001$ ; Fig. 1). The EC<sub>50</sub> was 43 (22-88)  $\mu$ M. *Post hoc* analysis revealed that the minimal effective relaxing concentration of GM1 ganglioside was 10  $\mu$ M. Figure 1C shows the representative trace showing the contracting and relaxing effects of Phe (1  $\mu$ M) and ACh (1  $\mu$ M), on mesenteric rings, and the relaxing effect after the exposure to cumulative concentrations of GM1.

Since there is evidence suggesting the involvement of nitric oxide on GM1-induced vasodilation (Furian et al. 2008), we investigated whether L-NAME alters GM1-induced vascular relaxation. L-NAME (1  $\mu$ M) completely inhibited GM1-induced

relaxation in rat mesenteric artery rings ( $P<0.001$ ; Fig. 2A and 2B). This finding is in agreement with previous studies which have reported an inhibitory effect of L-NAME on GM1-induced vasodilation (Furian et al. 2008). In addition, the guanylate cyclase inhibitor ODQ (10  $\mu$ M) attenuated the vasorelaxation induced by 3 mM GM1, further supporting a role for NO and the coupled guanylate cyclase system in the currently described effect of GM1 ( $P<0.001$ ; Fig. 2C and 2D).

It was well established that potassium channels are involved in the control of smooth muscle contractility and vascular tone. The incubation with non-selective potassium channel blocker TEA (1 mM) ( $P<0.001$ ; Fig. 3A and 3B), reduced GM1-induced vasorelaxation, suggesting the involvement of potassium channels in this effect. In addition, ATP-sensitive potassium channel blocker GLB (10  $\mu$ M) completely inhibited the vasorelaxation induced only by 3mM of GM1 ( $P<0.001$ ; Fig. 3C and 3D), providing additional experimental evidence for the involvement of  $K^+$  channels in GM1-induced vasodilation.

Furthermore, apamin (50 nM), a small conductance calcium-activated potassium channel blocker, had no effect on GM1 induced vasorelaxation ( $P=0.999$ ; Fig. 4A and 4B), whereas ChTX (50 nM), a blocker of large and intermediate conductance calcium-activated potassium channels, induced a concentration related right-shift in cumulative concentration-effect curve for GM1 ( $P<0.001$ ; Fig. 4C and 4D) increasing the  $EC_{50}$  from 114 (86-151)  $\mu$ M to 1 mM (668  $\mu$ M - 1mM).

We also measured tensions in controls after the incubation with enzyme inhibitors and channel blockers in the presence of Phe. Statistical analyses (paired T-Test) revealed that L-NAME (3,9 mN to 5,5 mN), ODQ (2,6 mN to 4,1 mN), and apamin (3,6 mN to 4 mN) significantly increased Phe-induced contraction. On the other hand, TEA, ChTX, and GLB did not change Phe-induced contraction (data not shown).



## Discussion

In this report we demonstrate that GM1 induces endothelium-dependent vasorelaxation in rat superior mesenteric arteries. In addition, we gathered pharmacological evidence supporting the involvement of the NO/sGC/cGMP pathway and of  $K_{Ca}$  and  $K_{ATP}$  channels in GM1-induced vasorelaxation.

There is some evidence suggesting that GM1 causes vasodilation (Tanaka et al. 1986) (Svennerholm et al. 2002). Accordingly, it has been shown that GM1 (30 mg/kg, i.v.) significantly restores local cerebral blood flow and glucose metabolism in animals subjected to arterial occlusion (Tanaka et al. 1986) and improves neurological status and cerebral blood flow in Alzheimer's diseased patients (Svennerholm et al. 2002), suggesting that vasodilation and better perfusion may underlie some pharmacological effects of GM1 administration. In addition, we have recently demonstrated that GM1 increases catalase content in brain samples by causing vasodilation (Furian et al. 2007), providing a possible convergent mechanism for the neuroprotective action of GM1 (Furian et al. 2007). Furthermore, a role for NO in GM1-induced vasodilation has been proposed, since L-NAME prevents GM1-induced NOx increase in cerebral slices and fully inhibits GM1-induced vasodilation in pial vessels (Furian et al. 2008). Interestingly, the concentration of GM1 that caused a 60% relaxation of the mesenteric artery in the current study (100  $\mu$ M, Fig. 1), increased by 50% NOx content in slices of cerebral cortex in a previous study (Furian et al. 2008).

In order to determine whether the vasorelaxing effect of GM1 involved NOS activation, mesenteric rings were incubated with the non-selective NOS inhibitor L-NAME (1  $\mu$ M) and then exposed to cumulative concentrations of GM1. L-NAME fully prevented the vascular relaxation induced by GM1, suggesting that NOS plays a crucial role in the vascular effects of GM1, as previously suggested for pial vessels. In addition,

GM1-induced relaxation depended on the endothelium integrity, reinforcing the role of endothelium-derived relaxing factors, particularly nitric oxide, in GM1-induced vasodilation.

Endothelial nitric oxide synthase is a dually acylated peripheral membrane protein that targets to the Golgi region and caveolae of endothelial cells, and can co-precipitate with caveolin-1, the structural protein of caveolae (Garcia-Cardena et al. 1997). This protein, in some instances, regulates the activity of other proteins targeted to caveolae, as potassium channels and calcium regulatory proteins (Saliez et al. 2008). These elements play an important functional role in the modulation of cell signal transduction pathways involved in eNOS activity. It has been demonstrated that caveolin-1 KO mice have increased NO-mediated relaxation in superior mesenteric arteries, and that increased vascular flow (Rizzo et al. 1998) promote eNOS dissociation from caveolin and association with calmodulin to activate the enzyme (Saliez et al. 2008). Sphingolipids are the major components of caveolae structure. Therefore, one might suggest that GM1, a sphingolipid, can promote eNOS dissociation from caveolin, by binding to CaM-binding domain of eNOS and determine the membrane association of the enzyme. However, this discussion is speculative in nature, and further studies are necessary to elucidate this point.

It is well known that NO-induced artery relaxation is predominantly mediated by the sequential activation of soluble guanylate cyclase (sGC), accumulation of cGMP (Moncada & Higgs 1991), cGMP-dependent protein kinase activation and subsequent K<sup>+</sup> channels opening (Alioua et al. 1998; Robertson et al. 1993). Accordingly, in order to evaluate the participation of the NO/sGC/cGMP pathway in GM1-induced vasodilation, we incubated the preparations with ODQ, an inhibitor of the NO-sensitive guanylate cyclase (Garthwaite et al. 1995). GM1-induced relaxation was partially

blocked by ODQ suggesting that the relaxing response elicited by GM1 involves the L-arginine/NO/sGC/cGMP pathway. The partial effect of ODQ on GM1-induced vascular relaxation markedly contrasted with the complete prevention of GM1-induced relaxation by L-NAME. Such a discrepancy could be explained by a direct stimulation of calcium-activated  $K^+$  channels by NO, without the participation of cGMP (Bolotina et al. 1994), suggesting that cGMP-independent pathways also play a role in the relaxing effect induced by GM1.

Potassium channels are the dominant ion conductive pathways in vascular muscle cells and their activity contribute to the regulation of muscle contractility and vascular tone (Jackson 2000; Nelson & Quayle 1995). Moreover, it has been reported that endothelium-derived relaxing factors, such as NO, induce vasorelaxation by activating  $K^+$  channels and consequently closing voltage-dependent calcium channels in the vascular smooth muscle (Nelson & Quayle 1995). Smooth muscle cells have been shown to express at least four different classes of potassium channels: voltage-activated  $K^+$  ( $K_V$ ), ATP-sensitive  $K^+$  ( $K_{ATP}$ ),  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  ( $K_{Ca}$ ) and inward rectifier  $K^+$  ( $K_{IR}$ ) channels (Jackson 2005). Therefore, in order to identify the  $K^+$  channels involved in the vasorelaxation induced by GM1 we incubated mesenteric ring preparations with  $K^+$  channels blockers TEA, GLB, ChTX and apamin. The findings that TEA and GLB prevent GM1-induced vasorelaxation suggest that ATP-sensitive potassium channels are important for its relaxing activity (Fig. 3). In addition, the relaxation induced by GM1 was right-shifted by ChTX, a large and intermediate conductance calcium activated potassium channel blocker (Fig. 4C), but not by apamin, a small conductance calcium-activated potassium channel blocker (Fig. 4A). These findings indicate that while large calcium-activated potassium channels are involved in the vascular relaxation induced by GM1, the involvement of small conductance calcium-activated potassium

channels is unlikely. These data are in agreement with the view that large conductance channels (BK<sub>Ca</sub>) are the main K<sub>Ca</sub> channels in microvascular smooth muscle cells (Jackson 2005). Interestingly, there is evidence suggesting that NO activates BK<sub>Ca</sub> either directly or indirectly, by activating protein kinases (Archer et al. 1994).

Furthermore, it is worth pointing out that drug-induced vasorelaxation depends on the tonus of the artery prior to drug exposure. Since inhibition of the NO pathway with NOS or sGC inhibitors and by blockers of K<sub>Ca</sub> channels could increase the basal tonus of the mesenteric ring, eliciting a stronger contraction with Phe, a functional antagonism may have come into play in these experiments. Therefore, we can not rule out partial functional antagonism as a cause for the currently described antagonism of GM1-induced vasorelaxation by 1  $\mu$ M L-NAME, 10 $\mu$ M ODQ and 50 nM apamin, even considering the widespread use of these agents at concentrations higher (i.e. 40-300  $\mu$ M for L-NAME; 0.1-10  $\mu$ M for ODQ; 100 nM for apamin) than those used in the current study to pharmacologically demonstrate the involvement of the NOS pathway and of K<sub>Ca</sub> channels in the vasodilating effect of several compounds (Sampson et al. 2001; Capasso et al. 2008; Tirapelli et al. 2008).

Regarding the possible clinical significance of the presently reported vasodilator effect of GM1, one must be aware that the concentrations of GM1 required for cause total relaxation are in the low millimolar range, which could be quite high to reach in the body fluids. However, it should be noted that intermediate concentrations of GM1, from 10 to 100  $\mu$ M, were able to cause 30-60 % of vasorelaxation in the present study. In this regard, a previous clinical study by Svennerholm et al. (2002), revealed that treatment of five Alzheimer's disease patients with GM1 (30 mg/24 h; i.c.v.) increased CSF GM1 concentrations to 40-60  $\mu$ M, which is close to the range of GM1 concentrations required to cause 30-60 % of vasorelaxation in mesenteric rings. In light of these results, we

think that the present data may have clinical significance, depending basically on the level of vasorelaxation required to reach therapeutic effects in a given condition. In light of this premise, it is remarkable that a 42 % increase in middle cerebral artery diameter by simvastatin treatment significantly ameliorates cerebral vasospasm and reduces neurological deficits resulting from subarachnoid hemorrhage in mice (McGirt et al., 2002).

In conclusion, our results demonstrate that GM1-induced vasorelaxation in mesenteric rings is endothelium-dependent, and mediated by the activation of the NO/sGC/cGMP pathway and  $K_{Ca}$  and  $K_{ATP}$  channels. Figure 5 shows an integrative view of the mechanisms which underlie the currently described vasorelaxing effect of GM1. While the mechanisms by which GM1 facilitates NO production are still unknown, our findings constitute strong experimental evidence supporting a role for NO and  $K^+$  channels in GM1-induced vasodilation in mesenteric artery rings. As a consequence, this study significantly contributes for the understanding of pharmacological effects of exogenous GM1, a compound that could improve the outcome in several experimental models of disorders associated with perfusional deficits, such as traumatic brain injury (Chen et al., 2003), anoxia (Carolei et al. 1991; Tan et al. 1993), ischemia (Carolei et al. 1991; Kwak et al. 2005) and Parkinson's (Schneider 1998) and Alzheimer's diseases (Svennerholm 1994; 2002; Yanagisawa 2007). On the other hand, a clinical trial with GM1 for ischemic stroke did not show enough evidence to conclude that gangliosides are beneficial in this situation (Candelise and Ciccone, 2002). However, factors such as time for initiating treatment, doses and patient sample size could underestimate potential benefic effects of neuroprotective agents in general (Wahlgren and Ahmed, 2004), and therefore more clinical studies are

needed to further evaluate the value of GM1 treatment for disorders associated with perfusional deficits.

### **Acknowledgements**

This work was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) [grant number 301552/2007-0]; and from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES). CNPq fellowships to [A.F.F., M.C.A.M., A.R.S.S., C.F.M]; and CAPES fellowships to [Y.D.R., M.S.O.].

The authors thank TRB Pharma, the Brazilian representative of Fidia Research Laboratories, for kindly donating GM1 ganglioside.

## References

- Alioua A, Tanaka Y, Wallner M, Hofmann F, Ruth P, Meera P and Toro L (1998) The large conductance, voltage-dependent, and calcium-sensitive K<sup>+</sup> channel, Hslo, is a target of cGMP-dependent protein kinase phosphorylation in vivo. *J Biol Chem* 273: 32950-32956.
- Archer SL, Huang JM, Hampl V, Nelson DP, Shultz PJ and Weir EK (1994) Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K channel by cGMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 7583-7587.
- Avrova NF, Tyurin VA, Tyurina Y and Kagan VE (1994) Gangliosides in postischemic cellular dysfunctions. *Ann N Y Acad Sci* 723:353-355.
- Avrova NF, Victorov IV, Tyurin VA, Zakharova IO, Sokolova TV, Andreeva NA, Stelmaschuk EV, Tyurina YY and Gonchar VS (1998) Inhibition of glutamate-induced intensification of free radical reactions by gangliosides: possible role in their protective effect in rat cerebellar granule cells and brain synaptosomes. *Neurochem Res* 23: 945-952.
- Bolotina VM, Najibi S, Palacino JJ, Pagano PJ and Cohen RA (1994) Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature* 368: 850-853.
- Calabrese V, Mancuso C, Calvani M, Rizzarelli E, Butterfield DA and Stella AM (2007) Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. *Nat Rev Neurosci* 8: 766-775.
- Candelise L and Ciccone A (2002) Gangliosides for Acute Ischemic Stroke. *Stroke* 33: 2336.

- Capasso R, Borrelli F, Aviello G, Capasso F and Izzo AA (2008) Inhibitory effect of the herbal antidepressant St John's wort (*Hypericum perforatum*) on rat gastric motility. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 376: 407–414.
- Carolei A, Fieschi C, Bruno R and Toffano G (1991) Monosialoganglioside GM1 in cerebral ischemia. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 3: 134-157.
- Chen ZG, Lu YC, Zhu C, Zhang GJ, Ding XH, Jiang JY (2003) Effects of ganglioside GM1 on reduction of brain edema and amelioration of cerebral metabolism after traumatic brain injury. *Chin J Traumatol* 6(1):23-27.
- Duchemin AM, Neff NH and Hadjiconstantinou M (1997) GM1 increases the content and mRNA of NGF in the brain of aged rats. *Neuroreport* 8: 3823-3827.
- Duchemin AM, Neff NH and Hadjiconstantinou M (1998) Induction of Trk phosphorylation in rat brain by GM1 ganglioside. *Ann N Y Acad Sci* 845: 406.
- Duchemin AM, Ren Q, Mo L, Neff NH and Hadjiconstantinou M (2002) GM1 ganglioside induces phosphorylation and activation of Trk and Erk in brain. *J Neurochem* 81: 696-707.
- Duchemin AM, Ren Q, Neff NH and Hadjiconstantinou M (2008) GM1-induced activation of phosphatidylinositol 3-kinase: involvement of Trk receptors. *J Neurochem* 104:1466-1477.
- Dudzinski DM and Michel T (2007) Life history of eNOS: partners and pathways. *Cardiovasc Res* 75: 247-260.
- Figuera MR, Bonini JS, de Oliveira TG, Frussa-Filho R, Rocha JB, Dutra-Filho CS, Rubin MA and Mello CF (2003) GM1 ganglioside attenuates convulsions and thiobarbituric acid reactive substances production induced by the intrastriatal injection of methylmalonic acid. *Int J Biochem Cell Biol* 35: 465-473.



- Fighera MR, Bonini JS, Frussa-Filho R, Dutra-Filho CS, Hagen ME, Rubin MA and Mello CF (2004) Monosialoganglioside increases catalase activity in cerebral cortex of rats. *Free Radic Res* 38: 495-500.
- Fighera MR, Royes LF, Furian AF, Oliveira MS, Fiorenza NG, Frussa-Filho R, Petry JC, Coelho RC and Mello CF (2006) GM1 ganglioside prevents seizures, Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity inhibition and oxidative stress induced by glutaric acid and pentylentetrazole. *Neurobiol Dis* 22: 611-623.
- Geisler FH, Coleman WP, Grieco, G, Poonian D, Sygen Study Group (2001) The Sygen multicenter acute spinal cord injury study. *Spin* 26 (24 Suppl): S87-98.
- Furchgott RF and Zawadzki JV (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288: 373-376.
- Furian AF, Oliveira MS, Royes LF, Fiorenza NG, Fighera MR, Myskiw JC, Weiblen R, Rubin MA, Frussa-Filho R and Mello CF (2007) GM1 ganglioside induces vasodilation and increases catalase content in the brain. *Free Radic Biol Med* 43: 924-932.
- Furian AF, Oliveira MS, Magni DV, Souza MA, Bortoluzzi VT, Bueno LM, Royes LF and Mello CF (2008) L-NAME prevents GM1 ganglioside-induced vasodilation in the rat brain. *Neurochem Int* 53: 362-369.
- Garcia-Cardena G, Martasek P, Masters BS, Skidd PM, Couet J, Li S, Lisanti MP and Sessa WC (1997) Dissecting the interaction between nitric oxide synthase (NOS) and caveolin. Functional significance of the nos caveolin binding domain in vivo. *J Biol Chem* 272: 25437-25440.
- Garthwaite J, Southam E, Boulton CL, Nielsen EB, Schmidt K and Mayer B (1995) Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one. *Mol Pharmacol* 48: 184-188.

- Govoni V, Granieri E, Manconi M, Capone J, Casetta I (2003) Is there a decrease in Guillain-Barre syndrome incidence after bovine ganglioside withdrawal in Italy? A population-based study in the Local Health District of Ferrara, Italy. *J Neurol Sci* 216: 99-103.
- Jackson WF (1998) Potassium channels and regulation of the microcirculation. *Microcirculation* 5: 85-90.
- Jackson WF (2000) Ion channels and vascular tone. *Hypertension* 35: 173-178.
- Jackson WF (2005) Potassium channels in the peripheral microcirculation. *Microcirculation* 12: 113-127.
- Katsuki S, Arnold W, Mittal C and Murad F (1977) Stimulation of guanylate cyclase by sodium nitroprusside, nitroglycerin and nitric oxide in various tissue preparations and comparison to the effects of sodium azide and hydroxylamine. *J Cyclic Nucleotide Res* 3: 23-35.
- Komagamine T, Yuki N (2006) Ganglioside mimicry as a cause of Guillain-Barré syndrome. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 5(4): 391-400.
- Kwak DH, Kim SM, Lee DH, Kim JS, Kim SM, Lee SU, Jung KY, Seo BB and Choo YK (2005) Differential expression patterns of gangliosides in the ischemic cerebral cortex produced by middle cerebral artery occlusion. *Mol Cells* 20: 354-360.
- Ledeen RW and Yu RK (1982) Gangliosides: structure, isolation, and analysis. *Methods Enzymol* 83: 139-191.
- McGirt MJ, Lynch JR, Parra A, Sheng H, Pearlstein RD, Laskowitz DT, Pelligrino DA and Warner DS (2002) Simvastatin increases endothelial nitric oxide synthase and ameliorates cerebral vasospasm resulting from subarachnoid hemorrhage. *Stroke* 33: 2950-2956.

- Mo L, Ren Q, Duchemin AM, Neff NH and Hadjiconstantinou M (2005) GM1 and ERK signaling in the aged brain. *Brain Res* 1054: 125-134.
- Moncada S and Higgs EA (1991) Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. *Eur J Clin Invest* 21: 361-374.
- Nelson MT and Quayle JM (1995) Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am J Physiol* 268: C799-822.
- Palmer RM, Ferrige AG and Moncada S (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327: 524-526.
- Rabin SJ, Bachis A and Mocchetti I (2002) Gangliosides activate Trk receptors by inducing the release of neurotrophins. *J Biol Chem* 277: 49466-49472.
- Rattmann YD, Crestani S, Lapa FR, Miguel OG, Marques MC, da Silva-Santos JE and Santos AR (2009) Activation of muscarinic receptors by a hydroalcoholic extract of *Dicksonia sellowiana* Presl. *HooK* (Dicksoniaceae) induces vascular relaxation and hypotension in rats. *Vascul Pharmacol* 50: 27-33.
- Rizzo V, McIntosh DP, Oh P and Schnitzer JE (1998) In situ flow activates endothelial nitric oxide synthase in luminal caveolae of endothelium with rapid caveolin dissociation and calmodulin association. *J Biol Chem* 273: 34724-34729.
- Robertson BE, Schubert R, Hescheler J and Nelson MT (1993) cGMP-dependent protein kinase activates Ca-activated K channels in cerebral artery smooth muscle cells. *Am J Physiol* 265: C299-303.
- Saliez J, Bouzin C, Rath G, Ghisdal P, Desjardins F, Rezzani R, Rodella LF, Vriens J, Nilius B, Feron O, Balligand JL and Dessy C (2008) Role of caveolar compartmentation in endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated relaxation: Ca<sup>2+</sup> signals and gap junction function are regulated by caveolin in endothelial cells. *Circulation* 117: 1065-1074.

- Sampson LJ, Plane F, and Garland CJ (2001) Involvement of cGMP and potassium channels in relaxation evoked by nitric oxide donor, diethylamine NONOate, in the rat small isolated mesenteric artery. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 364: 220–225.
- Schneider JS (1998) GM1 ganglioside in the treatment of Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci* 845: 363-373.
- She JQ, Wang M, Zhu DM, Tang M, Chen JT, Wang L and Ruan DY (2009) Monosialoanglioside (GM1) prevents lead-induced neurotoxicity on long-term potentiation, SOD activity, MDA levels, and intracellular calcium levels of hippocampus in rats. *Naunyn-Schmied Arch Pharmacol* 379: 517-524.
- Svennerholm L (1994) Gangliosides-a new therapeutic agent against stroke and Alzheimer's disease. *Life Sci* 55: 2125-2134.
- Svennerholm L, Brane G, Karlsson I, Lekman A, Ramstrom I and Wikkelso C (2002) Alzheimer disease - effect of continuous intracerebroventricular treatment with GM1 ganglioside and a systematic activation programme. *Dement Geriatr Cogn Disord* 14: 128-136.
- Tan WK, Williams CE, Gunn AJ, Mallard EC and Gluckman PD (1993) Pretreatment with monosialoganglioside GM1 protects the brain of fetal sheep against hypoxic-ischemic injury without causing systemic compromise. *Pediatr Res* 34: 18-22.
- Tanaka K, Dora E, Urbanics R, Greenberg, JH, Toffano G and Reivich M (1986) Effect of the ganglioside GM1, on cerebral metabolism, microcirculation, recovery kinetics of ECoG and histology, during the recovery period following focal ischemia in cats. *Stroke* 17: 1170-1178.

- Tettamanti G (2004) Ganglioside/glycosphingolipid turnover: new concepts. *Glycoconj J* 20: 301-317.
- Tirapelli CR, Fukada SY, Yogi A, Chignalia AZ, Tostes RC, Lanchote VL, Cunha FQ, de Oliveira AM (2008) Gender-specific vascular effects elicited by chronic ethanol consumption in rats: a role for inducible nitric oxide synthase. *Brit J Pharmacol* 153: 468-479.
- Yanagisawa K (2007) Role of gangliosides in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 1768: 1943-1951.
- Yuki N (1998) Anti-ganglioside antibody and neuropathy: review of our research. *J Peripher Nerv Syst* 3: 3-18.
- Wahlgren NG, Ahmed N (2004) Neuroprotection in cerebral ischaemia: facts and fancies--the need for new approaches. *Cerebrovasc Dis* 17 Suppl 1: 153-166.

## Figure Legends

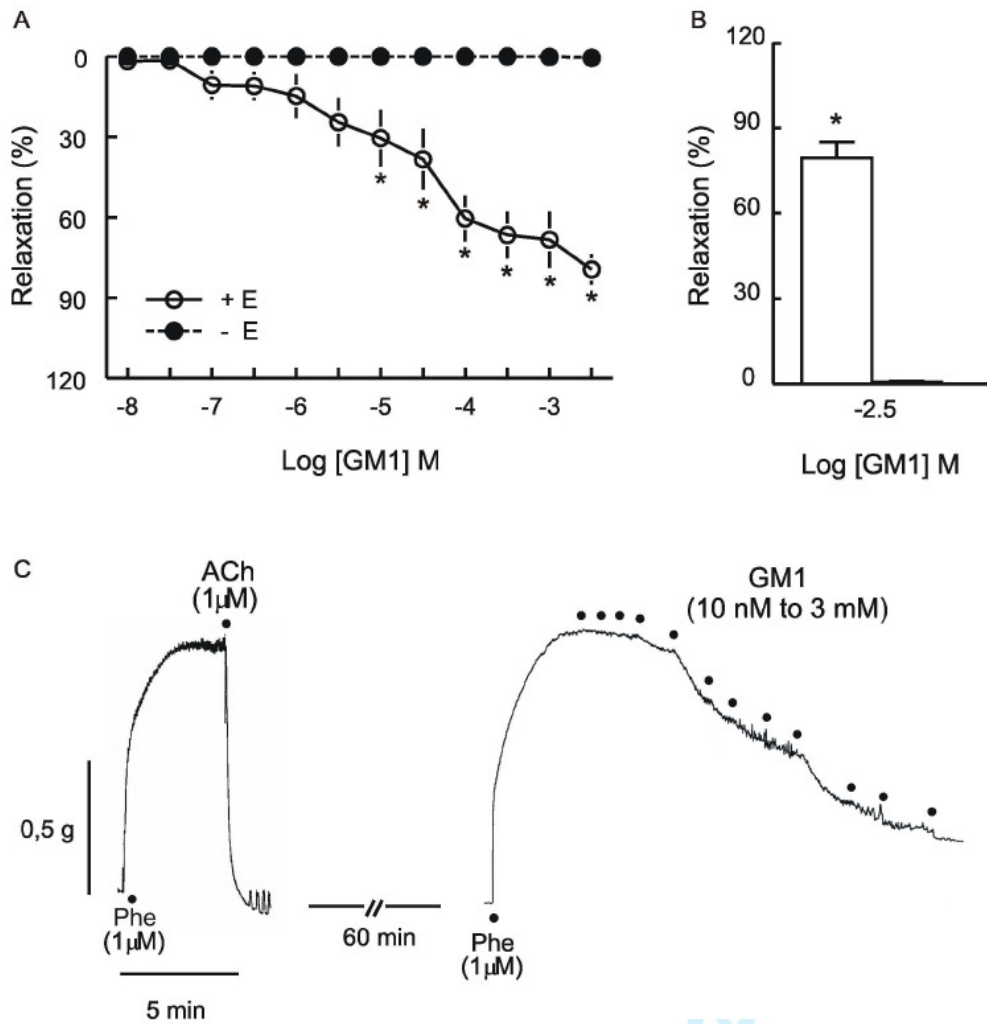
**Fig. 1** GM1 induces endothelium-dependent relaxation in rat mesenteric rings. (A) Relaxing effect of GM1 (10, 30, 100, 300 nM, 1, 3, 10, 30, 100, 300  $\mu$ M, 1 and 3 mM) in endothelium-intact (indicated by +E) and endothelium-denuded (indicated by -E) mesenteric rings. (B) Relaxing effect of GM1 (3 mM) in the presence and absence of endothelium. Data are mean  $\pm$  S.E.M., n=6. \*  $P < 0.05$  when compared to the respective control. (C) Representative trace showing the contracting and relaxing effects of Phe (1  $\mu$ M) and ACh (1  $\mu$ M), respectively, on mesenteric rings maintained at a basal tension of 5 mN. After 60 minutes, mesenteric rings were exposed to cumulative concentrations of GM1. Dots indicate the addition of the drugs.

**Fig. 2** GM1 induces NO/sGC/cGMP-dependent relaxation in rat mesenteric rings. (A) The NOS inhibitor L-NAME (1  $\mu$ M) prevents and (C) the guanylate cyclase inhibitor ODQ attenuates GM1-induced vasorelaxation. Figures 2B and 2D show the effect of L-NAME and ODQ on the vasorelaxant effects of GM1 (3 mM). Data are mean  $\pm$  S.E.M. \*  $P < 0.05$  when compared to the respective control (n=6-7 per group).

**Fig. 3** Potassium channel blockers inhibit GM1-induced mesenteric relaxation. Effect of GM1 in the absence (control curve) or presence of (A) tetraethylammonium (TEA, n=7), (C) glibenclamide (GLB, n=6). Figures 3B and 3D shows the effect of GM1 3 mM in the presence and absence of potassium channels blockers. Data are mean  $\pm$  S.E.M. \* $P < 0.05$  when compared to the respective control.

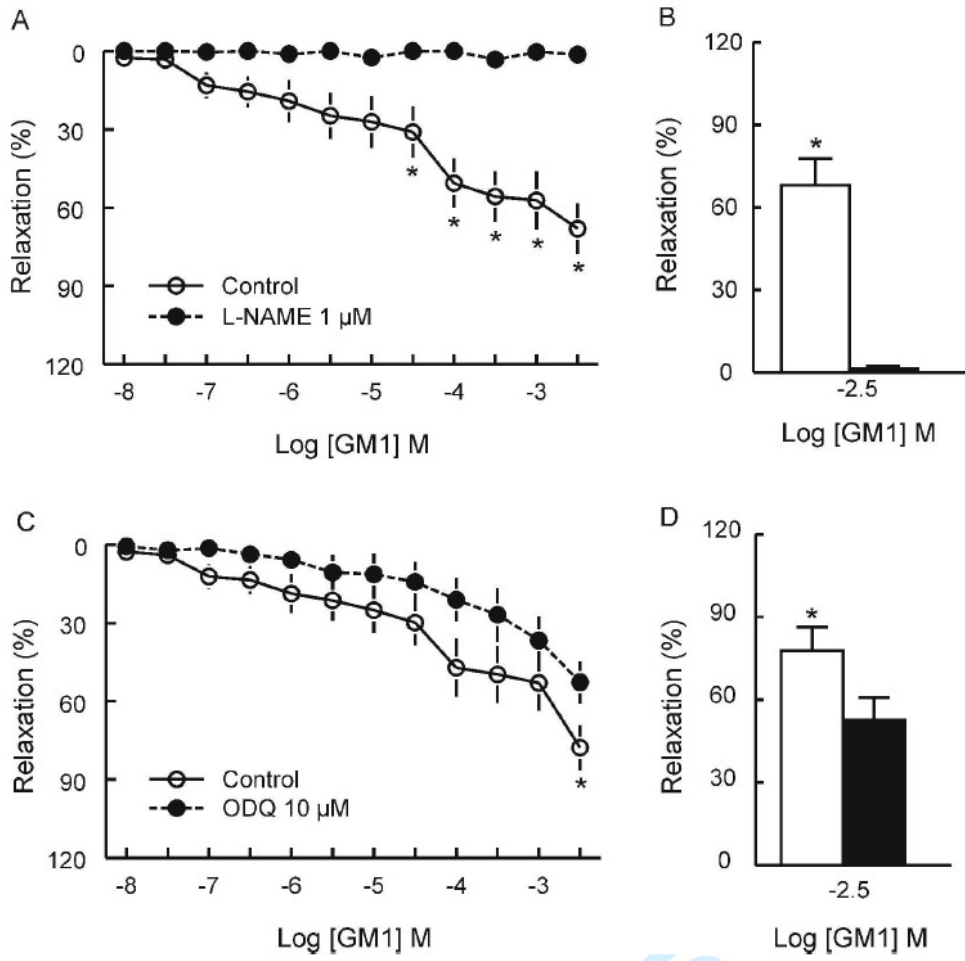
**Fig. 4** Inhibition of GM1-induced mesenteric relaxation by conductance calcium-activated potassium channel blockers. Effect of GM1 in the absence (control curve) or presence of (A) apamin (n=5) and (C) charybdotoxin (ChTX, n=5). Figure 4B and 4D show the effect of GM1 3 mM in the presence and absence of apamin and ChTX. Data are mean  $\pm$  S.E.M. \**P* < 0.05 when compared to the respective control.

**Fig. 5** Representation of the proposed pathways activated by GM1 to induce vasorelaxation in mesenteric artery rings. GM1 increases NO levels, which activate sGC, increasing cGMP levels. cGMP activates  $K_{Ca}$ ,  $K_V$  and  $K_{ATP}$  channels, promoting vasorelaxation. In addition, NO may directly activate  $K_{Ca}$ , promoting vasorelaxation. The vasorelaxating effect of GM1 disappeared when the endothelium was not intact and fully prevented in the presence of the NOS inhibitor L-NAME. The sGC inhibitor, ODQ, partially prevented GM1 induced-relaxation. Potassium channel blockers, namely, TEA and GLB also prevented the effect of GM1, while the  $K_{Ca}$  blocker, ChTX induced a concentration related right-shift in cumulative concentration-effect curve for GM1. Blockers/Inhibitors are presented in gray and bold and enzymes in italics. Dotted and solid lines represent activation of partially and fully known pathways, respectively. Abbreviations: L-NAME:  $N^G$ -nitro- l-arginine methyl ester; L-arg: L-arginine; L- cit: L-citrulline; eNOS: endothelial nitric oxide synthase; sGC: guanylate cyclase soluble; cGMP: cyclic guanosine monophosphate; ODQ: 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3- $\alpha$ ]quinoxalin-1-one;  $K_{Ca}$ : calcium-activated potassium channel; TEA: tetraethylammonium; ChTX: charybdotoxin;  $K_{ATP}$ : ATP-sensitive potassium channel; GLB: glibenclamide;  $K_V$ : voltage-sensitive potassium channel.

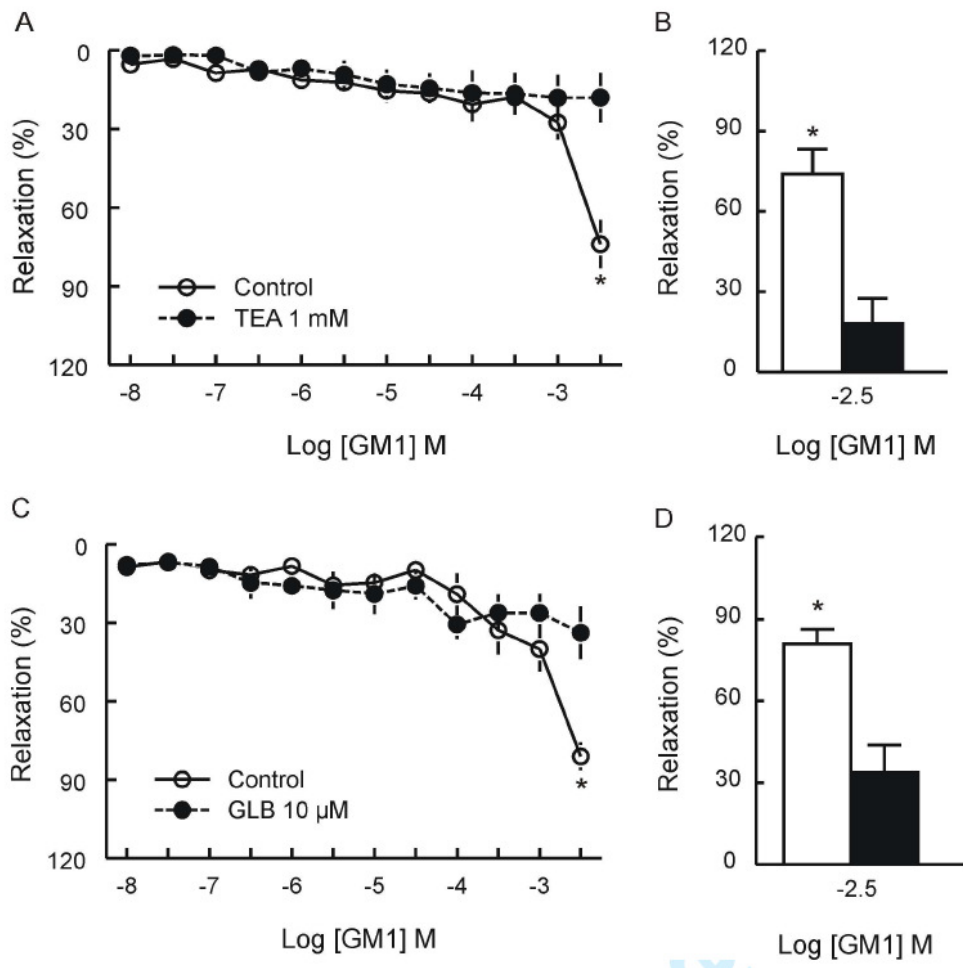


**Figure 1**





**Figure 2**



**Figure 3**

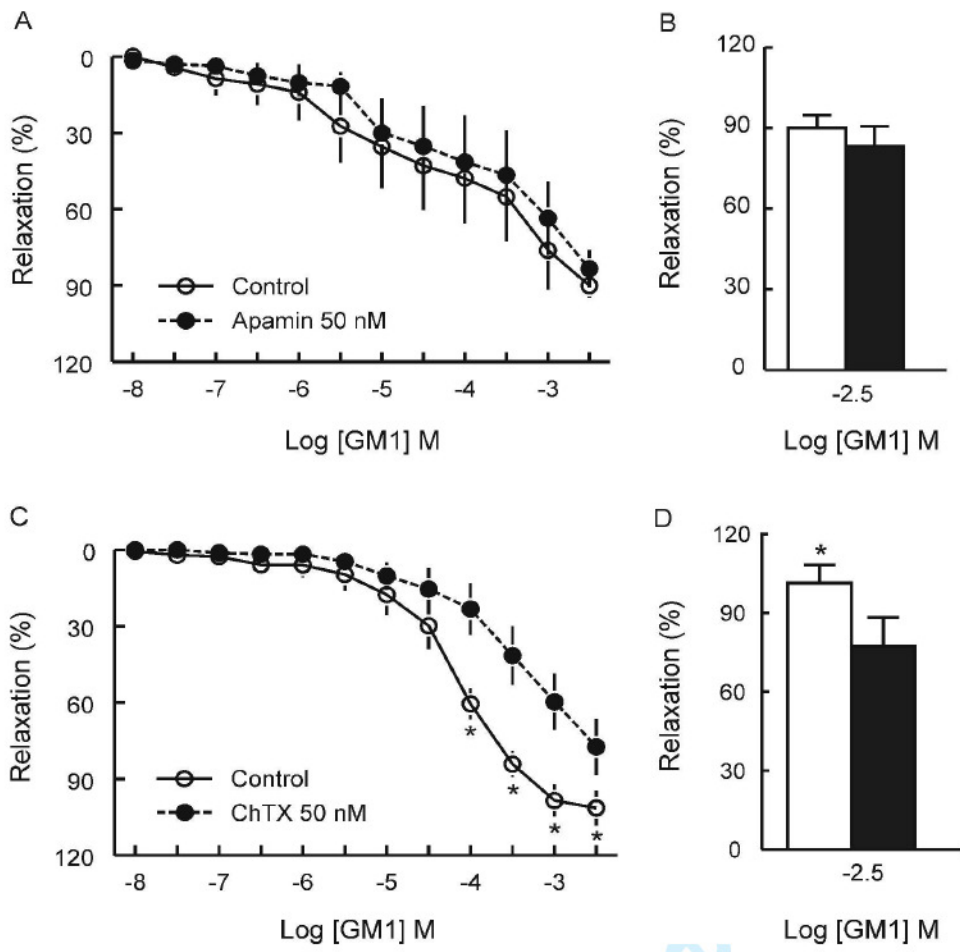
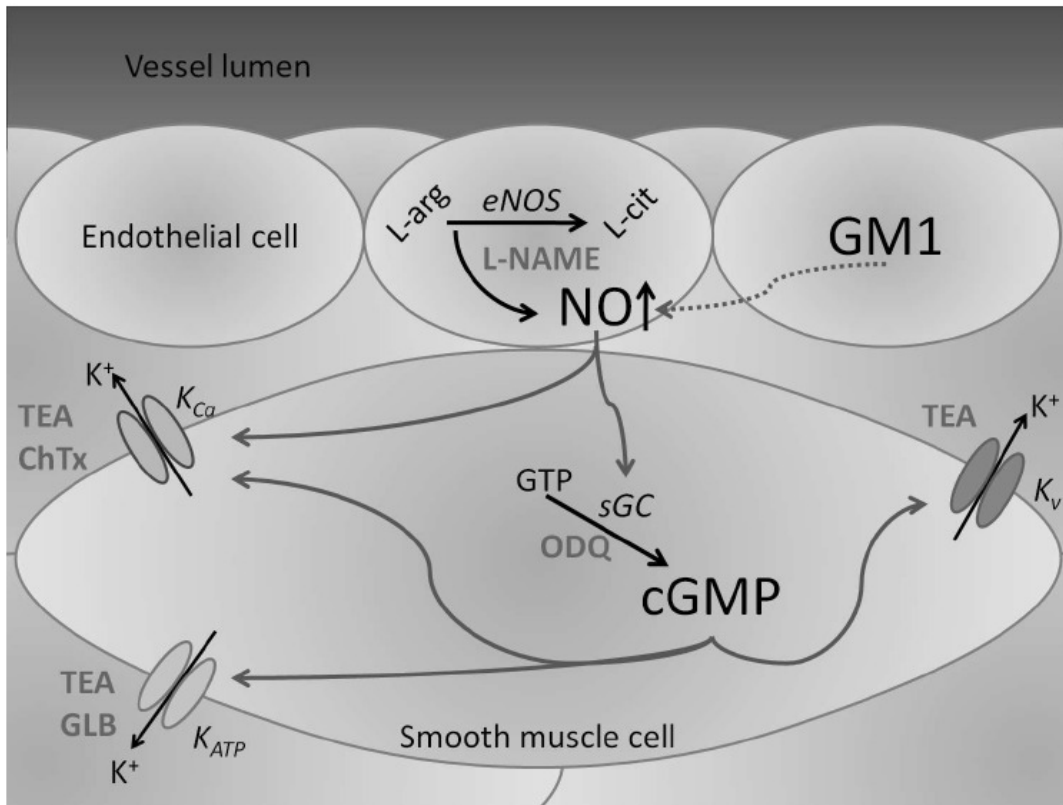


Figure 4



**Figure 5**

## 4. DISCUSSÃO

Na primeira parte do presente trabalho nós mostramos que o GM1 causa vasodilatação e aumento do conteúdo de hemoglobina cerebral por ativação da NOS, uma enzima chave no controle do tônus vascular (Palmer et al., 1987) já que os efeitos do GM1 foram prevenidos pelo inibidor da NOS L-NAME. Nesse sentido é interessante mencionar que o GM1 ativa receptores Trk C (Duchemin et al., 2002, Rabin et al., 2002), e a ativação destes receptores causa um aumento de quatro vezes na produção de óxido nítrico em células do endotélio de vasos sanguíneos cerebrais (Takeo et al., 2003). Estes resultados estão de acordo com nossos dados sobre a vasodilatação induzida por GM1 e sua prevenção por L-NAME.

O NO está envolvido em várias funções celulares, e tem sido reconhecido como um dos principais reguladores fisiológicos do tônus vascular (Vallance et al., 1989; Moncada and Higgs, 1991). O NO é sintetizado pelas isoformas da NOS, as constitutivas nNOS e eNOS, que requerem a formação de complexos  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina, e pela iNOS, que não requer a formação de complexos  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina para sua ativação (Calabrese et al., 2007). A nNOS é expressa em grandes quantidades em diversas áreas cerebrais, como o córtex cerebral, estriado, amígdala, hipocampo, hipotálamo e tálamo (Vincent and Kimura, 1992, Rodrigo et al., 1994). Interessantemente, a nNOS também é encontrada em astrócitos e na camada adventícia de vasos sanguíneos cerebrais de ratos (Nozaki et al., 1993), enquanto a eNOS é principalmente expressa no endotélio (Marsden et al., 1993). A eNOS também é encontrada em outros tipos celulares, como neurônios e astrócitos humanos (Oka et al., 2004), e astrócitos de ratos (Colasanti et al., 1998) e ambas têm um papel importante na regulação da circulação cerebral (Furchgott and Vanhoutte, 1989; Lee, 2000). Assim, baseado nos dados do presente estudo nós não podemos concluir se alguma isoforma da

NOS é o alvo do GM1, e mais estudos são necessários para determinar se alguma isoforma da NOS em particular é ativada por GM1.

Devido à sua alta reatividade biológica e sua difusibilidade, a biossíntese de NO é controlada por diversos mecanismos, incluindo alterações transcricionais, traducionais e pós-traducionais da NOS e mudanças na disponibilidade de substratos, cofatores e reguladores putativos. Considerando os mecanismos de regulação rápidos, como os observados no presente trabalho, os mecanismos mais prováveis parecem envolver mudanças na disponibilidade de substratos e cofatores e fosforilação (Kavya et al., 2006). Neste contexto, diversos sítios de fosforilação por proteínas quinases são encontrados em todas as três isoformas da NOS. Por exemplo, a fosforilação da eNOS pela fosfatidilinositol-3-quinase/Akt promove ativação da enzima, resultando em aumento na síntese de NO (Dimmeler et al., 1998; Fulton et al., 1999). Além disso, inibidores da fosfatidilinositol-3-quinase/Akt como a wortmannina e o LY-294002 previnem o aumento no conteúdo de NO induzido por ativação da nNOS (Canabal et al., 2007), fornecendo mais evidências que a fosfatidilinositol-3-quinase/Akt ativam a NOS. Foi demonstrado que o GM1 ativa a fosfatidilinositol-3-quinase/Akt em concentrações comparáveis as usadas no presente estudo (Duchemin et al., 2007), é tentador propor que o GM1 ativa a NOS por mecanismos que envolvem a via da fosfatidilinositol-3-quinase/Akt. Contudo, mais estudos são necessários para testar esta hipótese e determinar como o GM1 ativa a NOS.

Sabe-se que os produtos estáveis formados a partir do NO como nitritos e nitratos (NOx) podem ser removidos *in vivo* pelo sangue (Kumura et al., 1994), um possível efeito do GM1 sobre os níveis de NOx poderiam ser subestimados *ex vivo*. De acordo com esta idéia, nós não encontramos um aumento no conteúdo de NOx *ex vivo* após administração de GM1. Entretanto, os experimentos realizados em fatias de córtex

cerebral de ratos revelaram que o GM1 aumentou a produção de NOx *in situ* após 30 minutos de incubação, na ausência de fluxo sanguíneo. Além disso, é interessante que o GM1 reduziu o conteúdo de NOx no hipocampo e córtex cerebral (*ex vivo*) e em fatias de córtex cerebral (*in situ*) após 60 minutos de incubação, e que esse efeito coincide temporalmente com o fim do efeito vasodilatador do GM1 *in vivo*. Uma possível explicação para este fato é que o acúmulo de NO causado pelo aumento na atividade da NOS poderia resultar em inibição desta enzima por retroalimentação (Assreuy et al., 1993). Assim, é plausível propor que um aumento no conteúdo de NO, 30 minutos após administração de GM1, pode resultar em uma subsequente diminuição da atividade da NOS, levando a uma diminuição no conteúdo de NOx 60 minutos após administração de GM1. De acordo com esta idéia, Baumgartner et al. (1997) e Tseng et al. (1998) mostraram que o GM1 (30 mg/kg, i.v. for 3 dias) previne o aumento nos níveis de citrulina cerebral (um subproduto do NO formado a partir da arginina como resultado da atividade da NOS) em cachorros submetidos a choque circulatório prolongado. Estes resultados, indicam um efeito bimodal do GM1 sobre a atividade da NOS determinado pelo tempo de exposição ao gangliosídeo, estão de acordo com os resultados obtidos por Dawson et al., (1995), que mostraram que a exposição por duas horas de células transfectadas com nNOS a gangliosídeos (incluindo GM1) diminui a atividade da NOS. Além disso, Higashi e Yamagata (1992) mostraram que enquanto baixas concentrações de gangliosídeos ativam, altas concentrações de gangliosídeos inibem enzimas dependentes de calmodulina. Considerando que incubações prolongadas com GM1 facilitam sua incorporação nas membranas (Riboni e Tettamanti, 1991) e aumentam sua disponibilidade celular, é possível sugerir que o efeito bifásico do GM1 sobre a atividade da NOS, pelo menos das isoformas constitutivas dependentes de calmodulina, possa ser devido ao efeito bifásico do GM1 sobre a formação dos complexos Ca<sup>2+</sup>-

calmodulina. Interessantemente, este efeito bifásico do GM1 pode ter importantes implicações para explicar seus efeitos neuroprotetores, já que combina os efeitos benéficos de melhorar a perfusão e a inibição da síntese tardia de espécies nitrosativas deletérias.

Na segunda parte do presente trabalho nós mostramos que a vasodilatação induzida por GM1 é dependente do endotélio em anéis de artérias mesentéricas superiores de ratos. Além disso, o efeito do GM1 ocorre pela ativação da via NO/sGC/cGMP e canais de potássio sensíveis ao ATP ou cálcio.

Para confirmar se os efeitos vasorelaxantes do GM1 envolvem ativação da NOS, os anéis de artéria mesentérica foram incubados com L-NAME (1  $\mu$ M) e então expostos a concentrações cumulativas de GM1. A incubação com L-NAME preveniu completamente o relaxamento vascular induzido por GM1, confirmando que a NOS tem um papel crucial na promoção dos efeitos vasculares do GM1, como encontrado para vasos piais. Além disso, nós encontramos que o vasorrelaxamento induzido por GM1 é dependente da integridade do endotélio, reforçando a participação de fatores relaxantes derivados do endotélio, particularmente o NO, na vasodilatação induzida por GM1.

É bem conhecido que a vasodilatação dependente de NO é predominantemente mediada pela ativação sequencial da guanilato ciclase solúvel (sGC), acúmulo de cGMP (Moncada & Higgs 1991), ativação da proteína quinase G e subsequente abertura de canais de K<sup>+</sup> (Robertson et al., 1993; Alioua et al., 1998). Para investigar a participação da via sGC/cGMP na vasodilatação induzida por GM1, nós incubamos os anéis de artéria mesentérica com ODQ, um inibidor da sGC (Garthwaite et al. 1995). A vasodilatação induzida por GM1 foi parcialmente prevenida pela incubação com ODQ, sugerindo que a resposta vasorelaxante induzida por GM1 envolve a via sGC/cGMP. O efeito parcial do ODQ sobre o relaxamento vascular induzido por GM1 não está



totalmente de acordo com a prevenção completa da vasodilatação induzida por GM1 com L-NAME. Estes resultados aparentemente contraditórios podem ser explicados por uma ativação direta de canais de  $K^+$  ativados por  $Ca^{2+}$  por NO, sem a participação da via sGC/cGMP (Bolotina et al., 1994), sugerindo que vias independentes de cGMP também participam da vasodilatação induzida por GM1. Nesse sentido, cabe mencionar que a eNOS é uma proteína duplamente acilada que está presente nas cavéolas de células endoteliais, e pode ser co-precipitada, com caveolina-1, a proteína estrutural das cavéolas (Garcia-Cardena et al., 1997). Esta proteína regula a atividade de outras proteínas presentes nas cavéolas como, por exemplo, a eNOS e canais de  $K^+$  (Saliez et al., 2008). Nesse contexto, foi demonstrado que anéis de artéria mesentérica preparados de camundongos nocaute para caveolina-1 apresentam maior relaxamento dependente de NO (Rizzo et al., 1998). Uma explicação para estes resultados é que um fluxo vascular aumentado promove dissociação da eNOS da caveolina-1 e associação com calmodulina para ativar a enzima (Saliez et al. 2008). Desde que esfingolipídeos são componentes importantes das cavéolas, é possível que o GM1, um esfingolipídeo, possa promover dissociação da eNOS da caveolina, ao se ligar ao domínio da calmodulina na eNOS. Contudo, esta discussão é especulativa por natureza, e mais estudos são necessários para esclarecer este ponto.

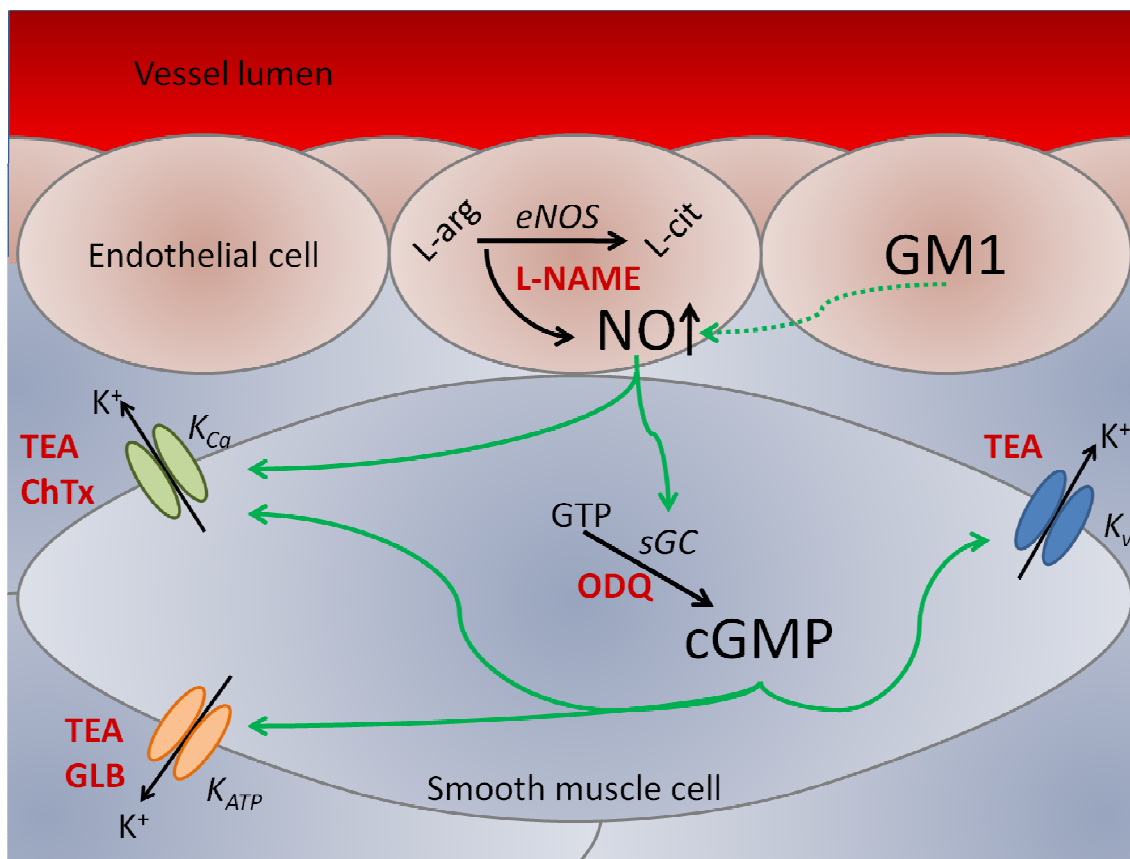
Os canais de  $K^+$  são os principais canais iônicos em células da musculatura vascular e sua atividade contribui para regulação da contratilidade da musculatura e do tônus vascular (Nelson and Quayle, 1995; Jackson, 2000). Além disso, tem sido mostrado que fatores relaxantes derivados do endotélio, como o NO, induzem vasorelaxação por ativar canais de  $K^+$  e fechar de canais de  $Ca^{2+}$  no músculo liso vascular (Nelson & Quayle 1995). Já foi demonstrado que as células da musculatura lisa vascular expressam pelo menos quatro diferentes classes de canais de  $K^+$ :

dependentes de voltagem ( $K_V$ ), sensíveis ao ATP ( $K_{ATP}$ ), ativados por  $Ca^{2+}$  ( $K_{Ca}$ ) e retificadores ( $K_{IR}$ ) (Jackson, 2005). Assim, na tentativa de identificar os canais de  $K^+$  envolvidos no vasorrelaxamento induzido por GM1, os anéis de artéria mesentérica foram incubados com os bloqueadores de canais de  $K^+$  TEA, GLB, ChTX e apamina. Os resultados mostraram que o TEA e a GLB preveniram o vasorelaxamento induzido por GM1 sugerindo que canais de  $K^+$  sensíveis ao ATP são importantes para o efeito do GM1. Além disso, a curva de relaxamento induzida por GM1 foi deslocada para direita sem redução do efeito máximo pela incubação com ChTX, um bloqueador dos canais de  $K^+$  ativados por  $Ca^{2+}$  de alta e intermediária condutância, mas não por apamina, um bloqueador dos canais de  $K^+$  ativados por  $Ca^{2+}$  de baixa condutância. Estes resultados sugerem o envolvimento dos canais de  $K^+$  ativados por  $Ca^{2+}$  de condutância alta e intermediária no efeito vasorelaxante induzido pelo GM1, e estão de acordo com os dados de que os canais de BKCa são o principal subtipo de canais KCa em células da musculatura lisa vascular (Jackson 2005). De fato, existem evidências que o NO ativa os canais  $K_{Ca}$  tanto de maneira direta quanto indireta, via ativação de proteínas quinases (Archer et al. 1994).

Em relação a significância clínica para os efeitos vasodilatadores do GM1 observados neste trabalho, deve-se ressaltar que as concentrações de GM1 requeridas para causar relaxamento total estão na faixa milimolar, que é muito maior que as concentrações encontradas nos fluídos corporais. Entretanto, as concentrações intermediárias (10 a 100  $\mu$ M) são capazes de causar 30-60 % de relaxamento. Neste sentido, um estudo clínico coordenado por Svennerholm e colaboradores (2002), mostrou que o tratamento com GM1 (30 mg/24 h; i.c.v.) em 5 pacientes com Doença de Alzheimer aumentou as concentrações de GM1 para 40-60  $\mu$ M no líquido. Estas concentrações estão de acordo com as utilizadas neste trabalho, e que causaram um

relaxamento de 30-60 % nos anéis de artéria mesentérica. Considerando este estudo, nós sugerimos que os resultados obtidos podem ter um significado clínico, dependendo do nível de relaxamento requerido para produzir efeitos terapêuticos em determinadas situações. Baseado nesta premissa é importante ressaltar que um aumento de 42% no diâmetro da artéria cerebral média, induzido pelo tratamento com sinvastatina, melhora significativamente o vasoespasma cerebral e reduz os déficits neurológicos resultantes de uma hemorragia subaracnóide em camundongos (McGirt et al., 2002).

Em resumo, nossos resultados demonstram que a vasodilatação induzida por GM1 em cérebro de ratos é dependente da atividade da NOS, e que o efeito do GM1 neste sistema é bifásico. Além disso, o vasorrelaxamento induzido por GM1 em anéis de artéria mesentérica superior de ratos depende da integridade do endotélio, ativação da NOS, sGC e canais de  $K^+$  ativados por  $Ca^{2+}$  de alta e intermediária condutância e canais de  $K^+$  sensíveis ao ATP. A figura 12 mostra uma ilustração com os mecanismos elucidados no presente estudo que estão envolvidos no vasorelaxamento induzido por GM1.



**Figura 12:** Proposição esquemática das vias ativadas por GM1 para induzir vasodilatação em anéis de artérias mesentéricas superiores de ratos. O GM1 aumenta os níveis de NO, que ativa a sGC, aumentando os níveis de cGMP. O cGMP ativa canais de  $K^+$  dos subtipos  $K_{Ca}$ ,  $K_V$  e  $K_{ATP}$ , promovendo vasorelaxamento. Além disso, o NO pode ativar diretamente os canais de  $K^+$  do subtipo  $K_{Ca}$ , promovendo vasorelaxamento. O efeito vasorelaxante do GM1 não foi encontrado quando o endotélio não estava intacto e foi completamente prevenido pela incubação com o inibidor da NOS L-NAME. O inibidor da sGC, ODQ, preveniu parcialmente o vasorelaxamento induzido por GM1. A incubação com os bloqueadores de canais de  $K^+$  TEA (bloqueador não-seletivo), GLB (canais sensíveis ao ATP) ou ChTX (canais ativados por  $Ca^{2+}$  de alta e intermediária condutância) preveniram os efeitos vasorelaxantes do GM1. Inibidores/bloqueadores são mostrados em vermelho e grafados em negrito, ao passo que enzimas são grafadas

em itálico. As linhas verdes pontilhadas ou sólidas representam vias parcialmente ou completamente conhecidas, respectivamente.

Abreviaturas: NO: óxido nítrico, L-NAME: NG-nitro- l-arginina metil éster; L-arg: L-arginina; L-cit: L-citrulina; eNOS: óxido nítrico sintase endotelial; sGC: guanilato ciclase solúvel; cGMP: monofostato de guanosina cíclico; ODQ: 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-alfa]quinoxalin-1-ona;  $K_{Ca}$ : canais de  $K^+$  ativados por  $Ca^{2+}$  de alta e intermediária condutância; TEA: tetraetilamônio; ChTX: caribdotoxina;  $K_{ATP}$ : canais de  $K^+$  sensíveis ao ATP; GLB: glibenclamida;  $K_V$ : canais de  $K^+$  dependentes de voltagem.

Enquanto os exatos mecanismos pelos quais o GM1 facilita a produção de NO ainda são desconhecidos, nossos resultados contribuem de maneira significativa para o entendimento das propriedades farmacológicas do gangliosídeo GM1 exógeno, um composto que tem potencial neuroprotetor em uma série de condições neurodegenerativas associadas com déficits perfusionais, como traumatismo crânio-encefálico (Chen et al., 2003), anóxia (Carolei et al. 1991; Tan et al. 1993), isquemia (Carolei et al. 1991; Kwak et al. 2005) e Mal de Parkinson (Schneider 1998) e Alzheimer (Svennerholm, 1994).

## 5. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos pode-se concluir que:

- A administração sistêmica de L-NAME previne o aumento no diâmetro dos vasos sanguíneos cerebrais induzido pelo GM1.

- A administração de GM1 não altera o conteúdo de NOx após 15 ou 30 minutos, porém provoca uma redução significativa após 60 minutos, tanto no hipocampo como no córtex cerebral de ratos *ex vivo*.

- A incubação de fatias de córtex cerebral com GM1 na concentração de 100  $\mu\text{M}$  GM1 produz um aumento expressivo do conteúdo de NOx aos 30 minutos, e uma redução significativa aos 60 minutos sem alterar o conteúdo de hemoglobina nas fatias de córtex cerebral de ratos *in situ*.

- O L-NAME reverte o aumento do conteúdo de NOx induzido pelo GM1 em fatias de córtex cerebral de ratos *in situ*.

- O GM1 produz relaxamento vascular em anéis de artéria mesentérica isolada;

- O relaxamento vascular induzido pelo GM1 é completamente dependente da presença do endotélio em anéis de artéria mesentérica isolada.

- O L-NAME reverte totalmente o relaxamento vascular induzido pelo GM1 e o ODQ reverteu parcialmente o efeito.

- O efeito relaxante do GM1 é revertido pela incubação com tetraetilamônio, glibenclamida e caribdotoxina, porém não é revertido pela incubação com apamina.

Em resumo, neste trabalho mostramos a participação do NO e dos canais de  $\text{K}^+$  na vasodilatação induzida pelo gangliosídeo GM1.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abu-Soud HM, Stuehr DJ (1993) Nitric oxide synthases reveal a role for calmodulin in controlling electron transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:10769-10772.
- Albertson TE, Walby WF (1987) The effect of exogenous GM1 ganglioside on kindled-amygdaloid seizures. *Neuropharmacology* 26:261-264.
- Alioua A, Tanaka Y, Wallner M, Hofmann F, Ruth P, Meera P, Toro L (1998) The large conductance, voltage-dependent, and calcium-sensitive K<sup>+</sup> channel, Hslo, is a target of cGMP-dependent protein kinase phosphorylation in vivo. *J Biol Chem* 273:32950-32956.
- Ando S, Chang NC, Yu RK (1978) High-performance thin-layer chromatography and densitometric determination of brain ganglioside compositions of several species. *Anal Biochem* 89:437-450.
- Ando S, Tanaka Y, Waki H, Kon K, Iwamoto M, Fukui F (2006) Gangliosides and related sialyl compounds as modulators of synaptic functions. *An New York Acad Sciences, Issue Sphingolipids as signaling modulators in the nervous system*, 845: 232 – 239.
- Appleman MM, Terasaki WL (1975) Regulation of cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Adv Cyclic Nucleotide Res* 5:153-162.
- Archer SL, Huang JM, Hampl V, Nelson DP, Shultz PJ, Weir EK (1994) Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K channel by cGMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:7583-7587.
- Arnold WP, Mittal CK, Katsuki S, Murad F (1977) Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:3203-3207.

- Asbury AK, McKhann GM (1997) Changing views of Guillain-Barre syndrome. *Ann Neurol* 41:287-288.
- Assreuy J, Cunha FQ, Liew FY, Moncada S (1993) Feedback inhibition of nitric oxide synthase activity by nitric oxide. *Br J Pharmacol* 108:833-837.
- Avrova NF, Tyurin VA, Tyurina Y, Kagan VE (1994) Gangliosides in postischemic cellular dysfunctions. *Ann N Y Acad Sci* 723:353-355.
- Avrova NF, Zakharova IO, Tyurin VA, Tyurina YY, Gamaley IA, Schepetkin IA (2002) Different metabolic effects of ganglioside GM1 in brain synaptosomes and phagocytic cells. *Neurochem Res* 27:751-759.
- Avrova NF, Victorov IV, Tyurin VA, Zakharova IO, Sokolova TV, Andreeva NA, Stelmaschuk EV, Tyurina YY, Gonchar VS (1998) Inhibition of glutamate-induced intensification of free radical reactions by gangliosides: possible role in their protective effect in rat cerebellar granule cells and brain synaptosomes. *Neurochem Res* 23:945-952.
- Ballough GP, Cann FJ, Smith CD, Forster JS, Kling CE, Filbert MG (1998) GM1 monosialoganglioside pretreatment protects against soman-induced seizure-related brain damage. *Mol Chem Neuropathol* 34:1-23.
- Baranowska M, Kozłowska H, Korbut A, Malinowska B (2007) [Potassium channels in blood vessels: their role in health and disease]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 61:596-605.
- Barreto, R. L & Correia, C. R. D. (2005) Óxido Nítrico: propriedades e potenciais usos terapêuticos. *Quim. Nova* 28 (6): 1046-1054, 2005.
- Bari F, Louis TM, Busija DW (1998) Effects of ischemia on cerebral arteriolar dilation to arterial hypoxia in piglets. *Stroke* 29:222-227; discussion 227-228.



- Baumgartner WA, Redmond M, Brock M, Tseng E, Blue ME, Troncoso JC, Johnston MV (1997) Pathophysiology of cerebral injury and future management. *J Card Surg* 12:300-310; discussion 310-301.
- Bolotina VM, Najibi S, Palacino JJ, Pagano PJ, Cohen RA (1994) Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature* 368:850-853.
- Bond CT, Maylie J, Adelman JP (1999) Small-conductance calcium-activated potassium channels. *Ann N Y Acad Sci* 868:370-378.
- Bradley KK, Jaggar JH, Bonev AD, Heppner TJ, Flynn ER, Nelson MT, Horowitz B (1999) Kir2.1 encodes the inward rectifier potassium channel in rat arterial smooth muscle cells. *J Physiol* 515 ( Pt 3):639-651.
- Brayden JE (2002) Functional roles of KATP channels in vascular smooth muscle. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 29:312-316.
- Calabrese V, Mancuso C, Calvani M, Rizzarelli E, Butterfield DA, Stella AM (2007) Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. *Nat Rev Neurosci* 8:766-775.
- Canabal DD, Potian JG, Duran RG, McArdle JJ, Routh VH (2007) Hyperglycemia impairs glucose and insulin regulation of nitric oxide production in glucose-inhibited neurons in the ventromedial hypothalamus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293:R592-600.
- Capasso R, Borrelli F, Aviello G, Capasso F, Izzo AA (2008) Inhibitory effect of the herbal antidepressant St. John's wort (*Hypericum perforatum*) on rat gastric motility. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 376:407-414.
- Carolei A, Fieschi C, Bruno R, Toffano G (1991) Monosialoganglioside GM1 in cerebral ischemia. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 3:134-157.

- Chauhan SD, Nilsson H, Ahluwalia A, Hobbs AJ (2003) Release of C-type natriuretic peptide accounts for the biological activity of endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:1426-1431.
- Chen ZG, Lu YC, Zhu C, Zhang GJ, Ding XH, Jiang JY (2003) Effects of ganglioside GM1 on reduction of brain edema and amelioration of cerebral metabolism after traumatic brain injury. *Chin J Traumatol* 6:23-27.
- Colasanti M, Persichini T, Fabrizi C, Cavalieri E, Venturini G, Ascenzi P, Lauro GM, Suzuki H (1998) Expression of a NOS-III-like protein in human astroglial cell culture. *Biochem Biophys Res Commun* 252:552-555.
- Coleman HA, Tare M, Parkington HC (2004) Endothelial potassium channels, endothelium-dependent hyperpolarization and the regulation of vascular tone in health and disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 31:641-649.
- Cohen, RA & Vanhoutte PM (1995) Endothelium-dependent hyperpolarization. Beyond nitric oxide and cyclic GMP. *Circulation* 92(11): 3337-3349
- Costa E, Armstrong D, Guidotti A, Kharlamov A, Kiedrowski L, Wroblewski JT (1993) Ganglioside GM1 and its semisynthetic lysogangliosides reduce glutamate neurotoxicity by a novel mechanism. *Adv Exp Med Biol* 341:129-141.
- Dal Toso, R., Skaper, S.D., Ferrari, G. (1988) Ganglioside involvement in membrane-mediated transfer of Trophic information: relationship to GM1 effects following CNS injury. In: Stein, D.G.; Sabel B.A. (eds.), *Pharmacological Approaches to the Treatment of Brain and Spinal Cord Injury*, p. 143-165, Plenum, New York, 1988.
- Daut J, Maier-Rudolph W, von Beckerath N, Mehrke G, Gunther K, Goedel-Meinen L (1990) Hypoxic dilation of coronary arteries is mediated by ATP-sensitive potassium channels. *Science* 247:1341-1344.

- Dawson TM, Hung K, Dawson VL, Steiner JP, Snyder SH (1995) Neuroprotective effects of gangliosides may involve inhibition of nitric oxide synthase. *Ann Neurol* 37:115-118.
- Degroote S, Wolthoorn J, van Meer G (2004) The cell biology of glycosphingolipids. *Seminars in Cell & Develop Biol* 15:375:387.
- De Giorgio R, Parodi JE, Brecha NC, Brunicardi FC, Becker JM, Go VL, Sternini C (1994) Nitric oxide producing neurons in the monkey and human digestive system. *J Comp Neurol* 342:619-627.
- Derry DM, Wolfe LS (1967) Gangliosides in isolated neurons and glial cells. *Science* 158:1450-1452.
- Dimmeler S, Assmus B, Hermann C, Haendeler J, Zeiher AM (1998) Fluid shear stress stimulates phosphorylation of Akt in human endothelial cells: involvement in suppression of apoptosis. *Circ Res* 83:334-341.
- Duchemin AM, Neff NH, Hadjiconstantinou M (1997) GM1 increases the content and mRNA of NGF in the brain of aged rats. *Neuroreport* 8:3823-3827.
- Duchemin AM, Neff NH, Hadjiconstantinou M (1998) Induction of Trk phosphorylation in rat brain by GM1 ganglioside. *Ann N Y Acad Sci* 845:406.
- Duchemin AM, Ren Q, Neff NH, Hadjiconstantinou M (2007) GM1-induced activation of phosphatidylinositol 3-kinase: involvement of Trk receptors. *J Neurochem*.
- Duchemin AM, Ren Q, Mo L, Neff NH, Hadjiconstantinou M (2002) GM1 ganglioside induces phosphorylation and activation of Trk and Erk in brain. *J Neurochem* 81:696-707.
- Edwards FR, Hirst GD, Silverberg GD (1988) Inward rectification in rat cerebral arterioles; involvement of potassium ions in autoregulation. *J Physiol* 404:455-466.

- Ellis EF, Oelz O, Roberts LJ, 2nd, Payne NA, Sweetman BJ, Nies AS, Oates JA (1976) Coronary arterial smooth muscle contraction by a substance released from platelets: evidence that it is thromboxane A<sub>2</sub>. *Science* 193:1135-1137.
- Facci L, Leon A, Skaper SD (1990) Excitatory amino acid neurotoxicity in cultured retinal neurons: involvement of N-methyl-D-aspartate (NMDA) and non-NMDA receptors and effect of ganglioside GM1. *J Neurosci Res* 27:202-210.
- Farooqui T, Franklin T, Pearl DK, Yates AJ (1997) Ganglioside GM1 enhances induction by nerve growth factor of a putative dimer of TrkA. *J Neurochem* 68:2348-2355.
- Favaron M, Manev H, Alho H, Bertolino M, Ferret B, Guidotti A, Costa E (1988) Gangliosides prevent glutamate and kainate neurotoxicity in primary neuronal cultures of neonatal rat cerebellum and cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:7351-7355.
- Feletou M, Vanhoutte PM (1988) Endothelium-dependent hyperpolarization of canine coronary smooth muscle. *Br J Pharmacol* 93:515-524.
- Figuera MR, Bonini JS, Frussa-Filho R, Dutra-Filho CS, Hagen ME, Rubin MA, Mello CF (2004) Monosialoganglioside increases catalase activity in cerebral cortex of rats. *Free Radic Res* 38:495-500.
- Figuera MR, Bonini JS, de Oliveira TG, Frussa-Filho R, Rocha JB, Dutra-Filho CS, Rubin MA, Mello CF (2003) GM1 ganglioside attenuates convulsions and thiobarbituric acid reactive substances production induced by the intrastriatal injection of methylmalonic acid. *Int J Biochem Cell Biol* 35:465-473.
- Figuera MR, Royes LF, Furian AF, Oliveira MS, Fiorenza NG, Frussa-Filho R, Petry JC, Coelho RC, Mello CF (2006) GM1 ganglioside prevents seizures, Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-

- ATPase activity inhibition and oxidative stress induced by glutaric acid and pentylenetetrazole. *Neurobiol Dis* 22:611-623.
- Fong TG, Neff NH, Hadjiconstantinou M (1997) GM1 ganglioside improves spatial learning and memory of aged rats. *Behav Brain Res* 85:203-211.
- Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, Walsh K, Franke TF, Papapetropoulos A, Sessa WC (1999) Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* 399:597-601.
- Furchgott RF, Zawadzki JV (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288:373-376.
- Furchgott RF (1983) Role of endothelium in responses of vascular smooth muscle. *Circ Res* 53:557-573.
- Furchgott RF, Martin W, Cherry PD (1985) Blockade of endothelium-dependent vasodilation by hemoglobin: a possible factor in vasospasm associated with hemorrhage. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res* 15:499-502.
- Furchgott RF, Vanhoutte PM (1989) Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *Faseb J* 3:2007-2018.
- Furian AF, Oliveira MS, Royes LF, Fiorenza NG, Figuera MR, Myskiw JC, Weiblen R, Rubin MA, Frussa-Filho R, Mello CF (2007) GM1 ganglioside induces vasodilation and increases catalase content in the brain. *Free Radic Biol Med* 43:924-932.
- Garcia-Cardena G, Martasek P, Masters BS, Skidd PM, Couet J, Li S, Lisanti MP, Sessa WC (1997) Dissecting the interaction between nitric oxide synthase (NOS) and caveolin. Functional significance of the nos caveolin binding domain in vivo. *J Biol Chem* 272:25437-25440.

- Garthwaite J, Boulton CL (1995) Nitric oxide signaling in the central nervous system. *Annu Rev Physiol* 57:683-706.
- Gauthier KM, Spitzbarth N, Edwards EM, Campbell WB (2004) Apamin-sensitive K<sup>+</sup> currents mediate arachidonic acid-induced relaxations of rabbit aorta. *Hypertension* 43:413-419.
- Geisler FH, Dorsey FC, Coleman WP (1991) Recovery of motor function after spinal-cord injury--a randomized, placebo-controlled trial with GM-1 ganglioside. *N Engl J Med* 324:1829-1838.
- Gillard BK, Thurmon LT, Marcus DM (1993) Variable subcellular localization of glycosphingolipids. *Glycobiology* 3:57-67.
- 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. *Neurochem. Int.* 15: 455-465.
- Gonatas NK, Stieber A, Gonatas J, Mommoi T, Fishman PH (1983) Endocytosis of exogenous GM1 ganglioside and cholera toxin by neuroblastoma cells. *Mol Cell Biol* 3:91-101.
- Ghosh, DK & Salerno JC (2003) Nitric oxide synthases: domain structure and alignment in enzyme function and control. *Front Biosci*, 8: 193-209.
- Govoni V, Granieri E, Tola MR, Paolino E, Casetta I, Fainardi E, Monetti VC (1997) Exogenous gangliosides and Guillain-Barre syndrome. An observational study in the local health district of Ferrara, Italy. *Brain* 120 ( Pt 7):1123-1130.
- Guix FX, Uribealago I, Coma M, Munoz FJ (2005) The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. *Prog Neurobiol* 76:126-152.
- Gutterman DD (1999) Adventitia-dependent influences on vascular function. *Am J Physiol* 277:H1265-1272.

- Hadjiconstantinou M, Neff NH (1998a) GM1 and the aged brain. *Ann N Y Acad Sci* 845:225-231.
- Hadjiconstantinou M, Neff NH (1998b) GM1 ganglioside: in vivo and in vitro trophic actions on central neurotransmitter systems. *J Neurochem* 70:1335-1345.
- Hakomori S (1981) Glycosphingolipids in cellular interaction, differentiation, and oncogenesis. *Annu Rev Biochem* 50:733-764.
- Higashi H, Yamagata T (1992) Mechanism for ganglioside-mediated modulation of a calmodulin-dependent enzyme. Modulation of calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase activity through binding of gangliosides to calmodulin and the enzyme. *J Biol Chem* 267:9839-9843.
- Huang PL (1999) Neuronal and endothelial nitric oxide synthase gene knockout mice. *Braz J Med Biol Res* 32:1353-1359.
- Huang PL, Huang Z, Mashimo H, Bloch KD, Moskowitz MA, Bevan JA, Fishman MC (1995) Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature* 377:239-242.
- Ignarro LJ, Byrns RE, Buga GM, Wood KS (1987) Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. *Circ Res* 61:866-879.
- Jackson WF (1998) Potassium channels and regulation of the microcirculation. *Microcirculation* 5:85-90.
- Jackson WF (2000) Ion channels and vascular tone. *Hypertension* 35:173-178.
- Jackson WF (2005) Potassium channels in the peripheral microcirculation. *Microcirculation* 12:113-127.

- Jackson WF, Konig A, Dambacher T, Busse R (1993) Prostacyclin-induced vasodilation in rabbit heart is mediated by ATP-sensitive potassium channels. *Am J Physiol* 264:H238-243.
- Jiang Z, Wallner M, Meera P, Toro L (1999) Human and rodent MaxiK channel beta-subunit genes: cloning and characterization. *Genomics* 55:57-67.
- Karpiak SE, Mahadik SP (1990) Enhanced cortical maturation: gangliosides in CNS plasticity. *Prog Brain Res* 85:299-308; discussion 308-299.
- Karpiak SE, Graf L, Rapport MM (1976) Antiserum to brain gangliosides produces recurrent epileptiform activity. *Science* 194:735-737.
- Karpiak SE, Mahadik SP, Graf L, Rapport MM (1981) An immunological model of epilepsy: seizures induced by antibodies to GM1 ganglioside. *Epilepsia* 22:189-196.
- Kavya R, Saluja R, Singh S, Dikshit M (2006) Nitric oxide synthase regulation and diversity: implications in Parkinson's disease. *Nitric Oxide* 15:280-294.
- Klenk, E. (1935) "Über die Natur der Phosphatide und anderer Lipide des Gehirns und der Leber in Niemann-Pickscher Krankheit." *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem* 235:24-36.
- Kleschyov AL, Muller B, Keravis T, Stoeckel ME, Stoclet JC (2000) Adventitia-derived nitric oxide in rat aortas exposed to endotoxin: cell origin and functional consequences. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279:H2743-2751.
- Knot HJ, Zimmermann PA, Nelson MT (1996) Extracellular K(+)-induced hyperpolarizations and dilatations of rat coronary and cerebral arteries involve inward rectifier K(+) channels. *J Physiol* 492 ( Pt 2):419-430.
- Ko EA, Han J, Jung ID, Park WS (2008) Physiological roles of K<sup>+</sup> channels in vascular smooth muscle cells. *J Smooth Muscle Res* 44:65-81.



- Kozireski-Chuback D, Wu G, Ledeen RW (1999a) Developmental appearance of nuclear GM1 in neurons of the central and peripheral nervous systems. *Brain Res Dev Brain Res* 115:201-208.
- Kozireski-Chuback D, Wu G, Ledeen RW (1999b) Upregulation of nuclear GM1 accompanies axon-like, but not dendrite-like, outgrowth in NG108-15 cells. *J Neurosci Res* 55:107-118.
- Kozireski-Chuback D, Wu G, Ledeen RW (1999c) Axonogenesis in neuro-2a cells correlates with GM1 upregulation in the nuclear and plasma membranes. *J Neurosci Res* 57:541-550.
- Krajnc D, Wemlinger TA, Neff NH, Hadjiconstantinou M (1994) Neonatal hypoxia: early neurotransmitter responses and the consequences of treatment with GM1 ganglioside. *J Pharmacol Exp Ther* 271:1299-1305.
- Krumenacker JS, Hanafy KA, Murad F (2004) Regulation of nitric oxide and soluble guanylyl cyclase. *Brain Res Bull* 62:505-515.
- Kumura E, Kosaka H, Shiga T, Yoshimine T, Hayakawa T (1994) Elevation of plasma nitric oxide end products during focal cerebral ischemia and reperfusion in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 14:487-491.
- Kuwabara S (2007) Guillain-barre syndrome. *Curr Neurol Neurosci Rep* 7:57-62.
- Kwak DH, Kim SM, Lee DH, Kim JS, Kim SM, Lee SU, Jung KY, Seo BB, Choo YK (2005) Differential expression patterns of gangliosides in the ischemic cerebral cortex produced by middle cerebral artery occlusion. *Mol Cells* 20:354-360.
- Langton PD, Nelson MT, Huang Y, Standen NB (1991) Block of calcium-activated potassium channels in mammalian arterial myocytes by tetraethylammonium ions. *Am J Physiol* 260:H927-934.

- Lazarewicz JW, Salinska E, Speina E, Gadamski R (1994) Effects of MK-801 and ganglioside GM1 on postischemic prostanoid release and hippocampal lesion in gerbil brain. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 54:293-305.
- Lazzaro A, Seren MS, Koga T, Zanoni R, Schiavo N, Manev H (1994) GM1 reduces infarct volume after focal cerebral ischemia. *Exp Neurol* 125:278-285.
- Ledeen RW (1978) Ganglioside structures and distribution: are they localized at the nerve ending? *J Supramol Struct* 8:1-17.
- Ledeen RW, Yu RK (1982) Gangliosides: structure, isolation, and analysis. *Methods Enzymol* 83:139-191.
- Lee TJ (2000) Nitric oxide and the cerebral vascular function. *J Biomed Sci* 7:16-26.
- Lewis S. (1994) Gangliosides on hold. *Lancet* 344:944.
- Lombardi G, Moroni F (1992) GM1 ganglioside reduces ischemia-induced excitatory amino acid output: a microdialysis study in the gerbil hippocampus. *Neurosci Lett* 134:171-174.
- Maccioni HJF, Daniotti JL, Martina JA (1999) Organization of gangliosides synthesis in the Golgi apparatus. *Biochem Biophys Acta* 1437:101-108.
- Magee T, Fuentes AM, Garban H, Rajavashisth T, Marquez D, Rodriguez JA, Rajfer J, Gonzalez-Cadavid NF (1996) Cloning of a novel neuronal nitric oxide synthase expressed in penis and lower urinary tract. *Biochem Biophys Res Commun* 226:145-151.
- Mahadik SP, Hawver DB, Hungund BL, Li YS, Karpiak SE (1989) GM1 ganglioside treatment after global ischemia protects changes in membrane fatty acids and properties of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase and Mg<sup>2+</sup>-ATPase. *J Neurosci Res* 24:402-412.
- Mahadik, S.P. & Karpiak, S.E. (1988) Gangliosides in treatment of neural injury and disease. *Drug Development Research*, 15: 337-360.

- Mahadik SP, Makar TK, Murthy JN, Ortiz A, Wakade CG, Karpiak SE (1993) Temporal changes in superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and catalase levels in primary and peri-ischemic tissue. Monosialoganglioside (GM1) treatment effects. *Mol Chem Neuropathol* 18:1-14.
- Marletta MA (1993) Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J Biol Chem* 268:12231-12234.
- Marsden PA, Heng HH, Scherer SW, Stewart RJ, Hall AV, Shi XM, Tsui LC, Schappert KT (1993) Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem* 268:17478-17488.
- Martin W, Villani GM, Jothianandan D, Furchgott RF (1985) Selective blockade of endothelium-dependent and glyceryl trinitrate-induced relaxation by hemoglobin and by methylene blue in the rabbit aorta. *J Pharmacol Exp Ther* 232:708-716.
- Matlung HL, Bakker EN, Vanbavel E (2009) Shear stress, reactive oxygen species and arterial structure and function. *Antioxid Redox Signal*.
- Maulik N, Das DK, Gogineni M, Cordis GA, Avrova N, Denisova N (1993) Reduction of myocardial ischemic reperfusion injury by sialylated glycosphingolipids, gangliosides. *J Cardiovasc Pharmacol* 22:74-81.
- McGirt MJ, Lynch JR, Parra A, Sheng H, Pearlstein RD, Laskowitz DT, Pelligrino DA and Warner DS (2002) Simvastatin increases endothelial nitric oxide synthase and ameliorates cerebral vasospasm resulting from subarachnoid hemorrhage. *Stroke* 33: 2950-2956.
- Merkel LA, Lappe RW, Rivera LM, Cox BF, Perrone MH (1992) Demonstration of vasorelaxant activity with an A1-selective adenosine agonist in porcine coronary artery: involvement of potassium channels. *J Pharmacol Exp Ther* 260:437-443.

- Miller C, Moczydlowski E, Latorre R, Phillips M (1985) Charybdotoxin, a protein inhibitor of single  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^{+}$  channels from mammalian skeletal muscle. *Nature* 313:316-318.
- Mo L, Ren Q, Duchemin AM, Neff NH, Hadjiconstantinou M (2005) GM1 and ERK signaling in the aged brain. *Brain Res* 1054:125-134.
- Mocchetti I (2005) Exogenous gangliosides, neuronal plasticity and repair, and the neurotrophins. *Cell Mol Life Sci* 62:2283-2294.
- Moncada S, Higgs EA (1991) Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. *Eur J Clin Invest* 21:361-374.
- Moncada S, Gryglewski R, Bunting S, Vane JR (1976) An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature* 263:663-665.
- Munzel T, Feil R, Mulsch A, Lohmann SM, Hofmann F, Walter U (2003) Physiology and pathophysiology of vascular signaling controlled by guanosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase [corrected]. *Circulation* 108:2172-2183.
- Nathan C, Xie QW (1994) Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J Biol Chem* 269:13725-13728.
- Nelson MT, Quayle JM (1995) Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am J Physiol* 268:C799-822.
- Nelson MT, Huang Y, Brayden JE, Hescheler J, Standen NB (1990) Arterial dilations in response to calcitonin gene-related peptide involve activation of  $\text{K}^{+}$  channels. *Nature* 344:770-773.
- Nozaki K, Moskowitz MA, Maynard KI, Koketsu N, Dawson TM, Bredt DS, Snyder SH (1993) Possible origins and distribution of immunoreactive nitric oxide

- synthase-containing nerve fibers in cerebral arteries. *J Cereb Blood Flow Metab* 13:70-79.
- O'Donnell VB (2003) Free radicals and lipid signaling in endothelial cells. *Antioxid Redox Signal* 5:195-203.
- Oka M, Wada M, Yamamoto A, Itoh Y, Fujita T (2004) Functional expression of constitutive nitric oxide synthases regulated by voltage-gated Na<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> channels in cultured human astrocytes. *Glia* 46:53-62.
- Opie, L. H. (1998). *The Heart-Physiology, from cell to circulation*. Philadelphia - New York, Raven.
- Orlando P, Cocciante G, Ippolito G, Massari P, Roberti S, Tettamanti G (1979) The fate of tritium labeled GM1 ganglioside injected in mice. *Pharmacol Res Commun* 11:759-773.
- Pagano PJ, Clark JK, Cifuentes-Pagano ME, Clark SM, Callis GM, Quinn MT (1997) Localization of a constitutively active, phagocyte-like NADPH oxidase in rabbit aortic adventitia: enhancement by angiotensin II. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:14483-14488.
- Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327:524-526.
- Palmer RM, Rees DD, Ashton DS, Moncada S (1988) L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochem Biophys Res Commun*. 153(3):1251-1256.
- Park WS, Ko JH, Kim N, Son YK, Kang SH, Warda M, Jung ID, Park YM, Han J (2007) Increased inhibition of inward rectifier K<sup>+</sup> channels by angiotensin II in small-diameter coronary artery of isoproterenol-induced hypertrophied model. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27:1768-1775.

- Persichini T, Cantoni O, Suzuki H, Colasanti M (2006) Cross-talk between constitutive and inducible NO synthase: an update. *Antioxid Redox Signal* 8:949-954.
- Pfitzer G (2001) Invited review: regulation of myosin phosphorylation in smooth muscle. *J Appl Physiol* 91:497-503.
- Polo A, Kirschner G, Guidotti A, Costa E (1994) Brain content of glycosphingolipids after oral administration of monosialogangliosides GM1 and LIGA20 to rats. *Mol Chem Neuropathol* 21:41-53.
- Quayle JM, McCarron JG, Brayden JE, Nelson MT (1993) Inward rectifier K<sup>+</sup> currents in smooth muscle cells from rat resistance-sized cerebral arteries. *Am J Physiol* 265:C1363-1370.
- Rabin SJ, Mocchetti I (1995) GM1 ganglioside activates the high-affinity nerve growth factor receptor trkA. *J Neurochem* 65:347-354.
- Rabin SJ, Bachis A, Mocchetti I (2002) Gangliosides activate Trk receptors by inducing the release of neurotrophins. *J Biol Chem* 277:49466-49472.
- Rahmann H (1995) Brain gangliosides and memory formation. *Behav Brain Res* 66:105-116.
- Rajasekaran M, Mondal D, Agrawal K, Chen IL, Hellstrom W, Sikka S (1998) Ex vivo expression of nitric oxide synthase isoforms (eNOS/iNOS) and calmodulin in human penile cavernosal cells. *J Urol* 160:2210-2215.
- Rapoport RM, Draznin MB, Murad F (1983) Endothelium-dependent vasodilator- and nitrovasodilator-induced relaxation may be mediated through cyclic GMP formation and cyclic GMP-dependent protein phosphorylation. *Trans Assoc Am Physicians* 96:19-30.

- Rapoport RM, Murad F (1983) Endothelium-dependent and nitrovasodilator-induced relaxation of vascular smooth muscle: role of cyclic GMP. *J Cyclic Nucleotide Protein Phosphor Res* 9:281-296.
- Rey FE, Li XC, Carretero OA, Garvin JL, Pagano PJ (2002) Perivascular superoxide anion contributes to impairment of endothelium-dependent relaxation: role of gp91(phox). *Circulation* 106:2497-2502.
- Riboni L, Tettamanti G (1991) Rapid internalization and intracellular metabolic processing of exogenous ganglioside by cerebellar granule cells differentiated in culture. *J Neurochem* 57:1931-1939.
- Rivers RJ, Hein TW, Zhang C, Kuo L (2001) Activation of barium-sensitive inward rectifier potassium channels mediates remote dilation of coronary arterioles. *Circulation* 104:1749-1753.
- Rizzo V, McIntosh DP, Oh P, Schnitzer JE (1998) In situ flow activates endothelial nitric oxide synthase in luminal caveolae of endothelium with rapid caveolin dissociation and calmodulin association. *J Biol Chem* 273:34724-34729.
- Robertson BE, Schubert R, Hescheler J, Nelson MT (1993) cGMP-dependent protein kinase activates Ca-activated K channels in cerebral artery smooth muscle cells. *Am J Physiol* 265:C299-303.
- Rodrigo J, Springall DR, Uttenthal O, Bentura ML, Abadia-Molina F, Riveros-Moreno V, Martinez-Murillo R, Polak JM, Moncada S (1994) Localization of nitric oxide synthase in the adult rat brain. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 345:175-221.
- Rosenblum WI (2003) ATP-sensitive potassium channels in the cerebral circulation. *Stroke* 34:1547-1552.

- Saha RN, Pahan K (2006) Regulation of inducible nitric oxide synthase gene in glial cells. *Antioxid Redox Signal* 8:929-947.
- Saito M, Mao RF, Wang R, Vadasz C, Saito M (2007) Effects of gangliosides on ethanol-induced neurodegeneration in the developing mouse brain. *Alcohol Clin Exp Res* 31:665-674.
- Saliez J, Bouzin C, Rath G, Ghisdal P, Desjardins F, Rezzani R, Rodella LF, Vriens J, Nilius B, Feron O, Balligand JL, Dessy C (2008) Role of caveolar compartmentation in endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated relaxation: Ca<sup>2+</sup> signals and gap junction function are regulated by caveolin in endothelial cells. *Circulation* 117:1065-1074.
- Sampson LJ, Plane F, Garland CJ (2001) Involvement of cyclic GMP and potassium channels in relaxation evoked by the nitric oxide donor, diethylamine NONOate, in the rat small isolated mesenteric artery. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 364:220-225.
- Saqr HE, Pearl DK, Yates AJ (1993) A review and predictive models of ganglioside uptake by biological membranes. *J Neurochem* 61:395-411.
- Schneider JS (1998) GM1 ganglioside in the treatment of Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci* 845:363-373.
- Schneider JS, Smith MG, DiStefano L, Berrian J (1994) GM1 ganglioside treatment partially reverses the nigrostriatal dopamine defect in the weaver mutant mouse. *Brain Res* 636:353-356.
- Schwartz M, Spirman N (1982) Sprouting from chicken embryo dorsal root ganglia induced by nerve growth factor is specifically inhibited by affinity-purified antiganglioside antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79:6080-6083.



- Silv RH, Bergamo M, Frussa-Filho R (2000) Effects of neonatal ganglioside GM1 administration on memory in adult and old rats. *Pharmacol Toxicol* 87:120-125.
- Silva RH, Felicio LF, Frussa-Filho R (1999) Ganglioside GM1 attenuates scopolamine-induced amnesia in rats and mice. *Psychopharmacology (Berl)* 141:111-117.
- Silva RH, Felicio LF, Nasello AG, Vital MA, Frussa-Filho R (1996) Effect of ganglioside (GM1) on memory in senescent rats. *Neurobiol Aging* 17:583-586.
- Singleton DW, Lu CL, Colella R, Roisen FJ (2000) Promotion of neurite outgrowth by protein kinase inhibitors and ganglioside GM1 in neuroblastoma cells involves MAP kinase ERK1/2. *Int J Dev Neurosci* 18:797-805.
- Skaper SD, Facci L, Leon A (1990) Gangliosides attenuate the delayed neurotoxicity of aspartic acid in vitro. *Neurosci Lett* 117:154-159.
- Skaper SD, Facci L, Milani D, Leon A (1989) Monosialoganglioside GM1 protects against anoxia-induced neuronal death in vitro. *Exp Neurol* 106:297-305.
- Sobey CG (2001) Potassium channel function in vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21:28-38.
- Sokolova TV, Zakharova IO, Furaev VV, Rychkova MP, Avrova NF (2007) Neuroprotective effect of ganglioside GM1 on the cytotoxic action of hydrogen peroxide and amyloid beta-peptide in PC12 cells. *Neurochem Res* 32:1302-1313.
- Spirman N, Sela BA, Schwartz M (1982) Antiganglioside antibodies inhibit neuritic outgrowth from regenerating goldfish retinal explants. *J Neurochem* 39:874-877.
- Stone JR, Marletta MA (1995) The ferrous heme of soluble guanylate cyclase: formation of hexacoordinate complexes with carbon monoxide and nitrosomethane. *Biochemistry* 34:16397-16403.

- Stuehr DJ, Kwon NS, Nathan CF, Griffith OW, Feldman PL, Wiseman J (1991) N omega-hydroxy-L-arginine is an intermediate in the biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. *J Biol Chem* 266:6259-6263.
- Svennerholm L (1956) Composition of gangliosides from human brain. *Nature* 177:524-525.
- Svennerholm, L. (1963) Isolation of gangliosides. *Acta Chemica Scandinavica* 17: 239-250.
- Svennerholm L (1980) Gangliosides and synaptic transmission. *Adv Exp Med Biol* 125:533-544.
- Svennerholm L (1994) Gangliosides--a new therapeutic agent against stroke and Alzheimer's disease. *Life Sci* 55:2125-2134.
- Svennerholm L, Brane G, Karlsson I, Lekman A, Ramstrom I, Wikkelso C (2002) Alzheimer disease - effect of continuous intracerebroventricular treatment with GM1 ganglioside and a systematic activation programme. *Dement Geriatr Cogn Disord* 14:128-136.
- Takeo C, Nakamura S, Tanaka T, Uchida D, Noguchi Y, Nagao T, Saito Y, Tatsuno I (2003) Rat cerebral endothelial cells express trk C and are regulated by neurotrophin-3. *Biochem Biophys Res Commun* 305:400-406.
- Tan WK, Williams CE, Gunn AJ, Mallard EC, Gluckman PD (1993) Pretreatment with monosialoganglioside GM1 protects the brain of fetal sheep against hypoxic-ischemic injury without causing systemic compromise. *Pediatr Res* 34:18-22.
- Tanaka K, Dora E, Urbanics R, Greenberg JH, Toffano G, Reivich M (1986) Effect of the ganglioside GM1, on cerebral metabolism, microcirculation, recovery kinetics of ECoG and histology, during the recovery period following focal ischemia in cats. *Stroke* 17:1170-1178.

- Tanaka Y, Koike K, Toro L (2004) MaxiK channel roles in blood vessel relaxations induced by endothelium-derived relaxing factors and their molecular mechanisms. *J Smooth Muscle Res* 40:125-153.
- Tettamanti G, Riboni L (1993) Gangliosides and modulation of the function of neural cells. *Adv Lipid Res* 25:235-267.
- Tirapelli CR, Fukada SY, Yogi A, Chignalia AZ, Tostes RC, Bonaventura D, Lanchote VL, Cunha FQ, de Oliveira AM (2008) Gender-specific vascular effects elicited by chronic ethanol consumption in rats: a role for inducible nitric oxide synthase. *Br J Pharmacol* 153:468-479.
- Tiurin VA, Bagrov A, Fedorova OV, Zhabko EP, Tiurina I, Avrova NF, Das DK, Kagan VE (1992) [Ganglioside protection of the erythrocyte membranes in myocardial ischemia]. *Biull Eksp Biol Med* 114:366-368.
- Tseng EE, Brock MV, Lange MS, Troncoso JC, Blue ME, Lowenstein CJ, Johnston MV, Baumgartner WA (1998) Monosialoganglioside GM1 inhibits neurotoxicity after hypothermic circulatory arrest. *Surgery* 124:298-306.
- Vaccarino F, Guidotti A, Costa E (1987) Ganglioside inhibition of glutamate-mediated protein kinase C translocation in primary cultures of cerebellar neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:8707-8711.
- Vallance P, Collier J, Moncada S (1989) Nitric oxide synthesised from L-arginine mediates endothelium dependent dilatation in human veins in vivo. *Cardiovasc Res* 23:1053-1057.
- Vanier MT, Holm M, Ohman R, Svennerholm L (1971) Developmental profiles of gangliosides in human and rat brain. *J Neurochem* 18:581-592.
- Veltmar A, Gohlke P, Unger T (1991) From tissue angiotensin converting enzyme inhibition to antihypertensive effect. *Am J Hypertens* 4:263S-269S.

- Vincent SR, Kimura H (1992) Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. *Neuroscience* 46:755-784.
- Xiao Z, Zhang Z, Ranjan V, Diamond SL (1997) Shear stress induction of the endothelial nitric oxide synthase gene is calcium-dependent but not calcium-activated. *J Cell Physiol* 171(2):205-211.
- Walker JS, Wingard CJ, Murphy RA (1994) Energetics of crossbridge phosphorylation and contraction in vascular smooth muscle. *Hypertension* 23:1106-1112.
- Wells JM, Ventura RF, Eisenhauer PB, McKenna DC, Fine RE, Ullman MD (1996) Transport of GM1 and GM1 inner ester across an in vitro model of the blood-brain barrier. *Neurosci Lett* 217:121-124.
- Wiegandt, H. Gangliosides. In: Neuberger, A., Van Deenen, L.L.M. (1985) (Eds), *Glycolipids, New Comprehensive Biochemistry*, 199-260. Elsevier, Amsterdam.
- Wu G, Lu ZH, Ledeen RW (1995) GM1 ganglioside in the nuclear membrane modulates nuclear calcium homeostasis during neurite outgrowth. *J Neurochem* 65:1419-1422.
- Wu G, Lu ZH, Wang J, Wang Y, Xie X, Meyenhofer MF, Ledeen RW (2005) Enhanced susceptibility to kainate-induced seizures, neuronal apoptosis, and death in mice lacking gangliotetraose gangliosides: protection with LIGA 20, a membrane-permeant analog of GM1. *J Neurosci* 25:11014-11022.
- Yanagisawa K (2007) Role of gangliosides in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 1768:1943-1951.
- Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T (1988) A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 332:411-415.

Yu RK, Saito M (1992) Gangliosides and neuronal-astrocytic interactions. *Prog Brain Res* 94:333-338.

Zhang H, Ding J, Tian W, Wang L, Huang L, Ruan Y, Lu T, Sha Y, Zhang D (2007) Ganglioside GM1 binding the N-terminus of amyloid precursor protein. *Neurobiol Aging*. 30: 1245-1253.