



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DO ARAGUAIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E
PARASITOLOGIA BÁSICAS E APLICADAS

JÉSSICA SILVA GONÇALVES MIGUEZ

**Papel da O-Glicosilação com N-Acetil-Glucosamina nas alterações vasculares
modulada pela ERK 1/2 via Interleucina-10**

Barra do Garças - MT

2017

JÉSSICA SILVA GONÇALVES MIGUEZ

**Papel da O-Glicosilação com N-Acetil-Glucosamina nas alterações vasculares
modulada pela ERK 1/2 via Interleucina-10**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Básicas e Aplicadas da Universidade Federal de Mato Grosso, Campus Universitário do Araguaia para obtenção do Título de Mestre.

Área de Concentração: Imunologia

Orientador: Dr. Victor Vitorino Lima

Co-Orientadora: Dr^a Fernanda R. C. G. Vitorino

Barra do Garças - MT

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Fonte.

S586p Silva Gonçalves Miguez, Jéssica.
Papel da O-Glicosilação com N-Acetil-Glucosamina nas
alterações vasculares modulada pela ERK 1/2 via Interleucina-10 /
Jéssica Silva Gonçalves Miguez. -- 2017
68 f. : il. color. ; 30 cm.

Orientador: Victor Vitorino Lima.
Co-orientadora: Fernanda Regina Casagrande Giachini Vitorino.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Mato Grosso,
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Programa de Pós-
Graduação em Imunologia e Parasitologia Básicas e Aplicadas,
Barra do Garças, 2017.
Inclui bibliografia.

1. O-GlcNAc. 2. Reatividade vascular. 3. IL-10. 4. ERK 1/2. I.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Permitida a reprodução parcial ou total, desde que citada a fonte.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DO ARAGUAIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E
PARASITOLOGIA BÁSICAS E APLICADAS

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: Papel da O-Glicosilação com N-Acetil-Glucosamina nas alterações vasculares
modulada pela ERK 1/2 via Interleucina-10

Autora: Jéssica Silva Gonçalves Miguez

Orientador: Prof. Dr. Victor Vitorino Lima

Co-orientadora: Profa. Dra. Fernanda Regina C. G. Vitorino

Banca examinadora:

Prof. Dr. Victor Vitorino Lima
Orientador

Prof^a. Dra. Paula Cristina S. Souto

Prof. Dr. Fernando Paranaíba Filgueira

Barra do Garças - MT

2017

Dedico este trabalho ao meu bebê Heitor,
que está chegando e já é muito amado.

Agradeço...

Primeiramente à Deus pela força e pelas oportunidades que sempre aparecem na hora certa.

Aos meus pais, Mozar e Suleymar, por toda a estrutura emocional e financeira que me proporcionaram, sem vocês eu não teria a segurança e a certeza de que sou capaz de alcançar todos os meus objetivos. Sou muito grata por todos os ensinamentos e exemplos.

Ao meu marido, Paulo César, por todos estes anos de paciência, companheirismo, amor e dedicação que foram essenciais para o meu crescimento acadêmico. Você me acompanhou no ensino médio, na graduação e agora no mestrado, me deixou a vontade para escolher os melhores caminhos, sempre me apoiando. Muito obrigada por tudo!

Aos meus irmãos, Lígia e Mozar Júnior, que apesar da distância sempre se fizeram presentes. Nossa ligação é eterna e gostaria muito de ter vocês por perto!

Ao meu orientador Victor Vitorino pelo exemplo de profissional e ser humano. Muito obrigada não apenas pela orientação, mas por ter sido meu psicólogo, amigo e fonte de inspiração. O início não foi fácil, mas sua paciência e dedicação fizeram toda a diferença. A sua dignidade me ensinou muito além do conhecimento científico!

A minha coorientadora querida Fernanda Giachini pelas palavras doces, pelos ensinamentos e pela calma que admiro. Você é uma grande mãezona, sempre disposta a nos proteger, indo além para nos ajudar.

Ao pessoal do laboratório pela receptividade e colaboração que foram fundamentais para que este período tenha deixado ótimas lembranças, sentirei saudades de todos. Foram dois anos de convivência, participando de tantos momentos uns dos outros. Quero expressar meu carinho especial a Raiany, ao

Rinaldo e ao Alexander, vocês fizeram meus dias mais alegres, amei conhecer vocês.

A minha parceira de mestrado e laboratório, Vanessa, por ter se tornado uma pessoa fundamental para o meu crescimento. Você me inspirou e me ajudou muito!!! Admiro sua determinação, caráter, responsabilidade, merece todo o sucesso que tenho certeza que vai alcançar. Meus dias não serão os mesmos sem a sua companhia de todos os dias. Muito obrigada!

Ao laboratório de Farmacologia Cardiovascular e Trato Urinário do Departamento de Farmacologia da USP de Ribeirão Preto por possibilitar que este trabalho tenha uma qualidade além do esperado, muito obrigada! Agradeço principalmente a prof. Rita Tostes, ao prof. Fernando Carneiro e a Camila Zanotto pela recepção.

Ao laboratório de Biomodulação e Saúde Materno-Infantil da UFMT por me ajudar a finalizar a parte experimental, obrigada a prof. Adenilda, a prof. Patrícia, a prof. Danny Laura pelo suporte oferecido.

Aos componentes da banca, Paula Cristina e Fernando Paranaíba, por aceitarem fazer parte deste momento tão importante, é uma honra ter a contribuição de vocês para o meu trabalho. Muito obrigada!

Por fim, o agradecimento mais especial ao meu bebê, por já me fazer tão feliz e por ter se comportado tão bem neste início de gravidez para que eu pudesse terminar com êxito este trabalho. Você não foi planejado, mas foi muito desejado. Este ano receberei meus dois certificados, o de mestre e o de mãe, e saiba que você sempre vai ser o mais importante. Mamãe te ama Heitor!

“A verdadeira viagem de descobrimento não consiste em procurar novas paisagens, mas em ter novos olhos”.

(Marcel Proust)

RESUMO

A O-Glicosilação com N-acetil-glucosamina (O-GlcNAc) é definida como uma modificação pós-traducional que atua em várias vias de sinalização, dentre estas temos proteínas com importante papel na função vascular. Por outro lado, diversos autores vêm demonstrando que a ausência da interleucina-10 (IL-10) pode favorecer à disfunção vascular. O objetivo deste estudo foi verificar se a O-GlcNAc promove alteração na vasoconstrição por mecanismos moduladores da cinase regulada por sinais extracelulares (ERK 1/2) via IL-10. Para isso, aorta de camundongos machos C57BL/6 (12 semanas) foram incubadas com Thiamet G (1 μ M, por 24 horas - inibidor seletivo da OGA capaz de aumentar os níveis global de O-GlcNAc). Também foram utilizados camundongos *knockout* para IL-10 (IL-10^{-/-}; B6.129P2-II10tm1Cgn/J; 12 semanas). Realizaram-se testes de reatividade vascular (n=6) e western blot para avaliar a expressão proteica. Os vasos de camundongos IL-10^{-/-} apresentaram uma maior vasoconstrição para fenilefrina quando comparados com o controle [Emax (%KCl)= 203,6 \pm 8,39 vs 163,0 \pm 10,64] e o mesmo pode ser observado em vasos tratados com Thiamet G (Emax (%KCl)= 167,9 \pm 3,46 vs 126,1 \pm 3,23), porém a incubação com um inibidor da ERK 1/2 preveniu estes efeitos (Emax (%KCl)= IL-10^{-/-}= 120,7 \pm 5,40; Thiamet G= 144,2 \pm 1,89). As análises de western blot revelaram que os vasos de camundongos IL-10^{-/-} apresentaram um aumento na expressão de ERK 1/2 (p= 0,0001), assim como os vasos tratados com Thiamet G (p= 0,0119), os quais também expressaram mais proteínas O-Glicosiladas (p= 0,0250). A enzima OGT permaneceu inalterada, enquanto a expressão de OGA se encontra elevada (p= 0,0285). Em relação a via de sinalização da IL-10, observou-se que apesar da enzima JAK1 estar mais expressa (p= 0,0287) nos vasos incubados com Thiamet G, a expressão da STAT3 encontra-se diminuída (p= 0,0048), o que resultou em níveis teciduais de IL-10 menores (p= 0,0001). Estes dados sugerem que o aumento da O-GlcNAc é capaz de aumentar a atividade da ERK 1/2 e este efeito é mediado pela diminuição na via de sinalização da IL-10, o que pode resultar em uma disfunção vascular.

Palavras-chave: O-GlcNAc, reatividade vascular, IL-10, ERK 1/2.

ABSTRACT

O-Glycosylation with N-acetyl-glucosamine (O-GlcNAc) is defined as a post-translational modification that acts on several signaling pathways, among which we have proteins with important role in vascular function. On the other hand, several authors have demonstrated that the absence of interleukin-10 (IL-10) may favor vascular dysfunction. The objective of this study was to verify if O-GlcNAc promotes alteration in vasoconstriction by kinase modulators regulated by extracellular signals (ERK 1/2) via IL-10. For this, aorta of male C57BL / 6 mice (12 weeks) were incubated with Thiamet G (1 μ M for 24 hours - selective OGA inhibitor capable of increasing overall levels of O-GlcNAc). *Knockout* mice for IL-10 (IL-10 $-/-$: B6.129P2-II10tm1Cgn / J; 12 weeks) were also used. Vascular reactivity (n= 6) and western blot tests were performed to evaluate protein expression. The vessels of IL-10 $-/-$ mice show a greater vasoconstriction for phenylephrine when compared to the control [Emax (% KCl) = 203.6 ± 8.39 vs 163.0 ± 10.64] and the same can be observed (Emax (% KCl) = 167.9 ± 3.46 vs. 126.1 ± 3.23), but incubation with an ERK 1/2 inhibitor prevented these effects (Emax (% KCl) = IL-10 $-/-$ = 120.7 ± 5.40 , Thiamet G = 144.2 ± 1.89). Western blot analysis revealed that IL-10 $-/-$ mice showed an increase in ERK 1/2 expression (p = 0.0001), as well as vessels treated with Thiamet G (p = 0.0119), which also expressed more O-Glycosylated proteins (p = 0.0250). The OGT enzyme remained unchanged, whereas OGA expression was elevated (p = 0.0285). Regarding the IL-10 signaling pathway, it was observed that although the JAK1 enzyme is more expressed (p= 0.0287) in the vessels incubated with Thiamet G, STAT3 expression is decreased (p= 0.0048), which resulted in lower IL-10 tissue levels (p= 0.0001). These data suggest that increased O-GlcNAc is able to increase ERK 1/2 activity and this effect is mediated by the decrease in the IL-10 signaling pathway, which may result in vascular dysfunction.

Keywords: O-GlcNAc, vascular reactivity, IL-10, ERK 1/2.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Via de Biossíntese de Hexosamina.	19
Figura 2. Contração do músculo liso vascular dependente da concentração de Ca^{2+}	26
Figura 3. Contração do músculo liso vascular independente da concentração de Ca^{2+} via ativação de ERK 1/2.	28
Figura 4. Via de Sinalização de Interleucina-10.	31
Figura 5. Hipótese de Trabalho	34
Figura 6. Desenho Experimental I.	37
Figura 7. Desenho Experimental II	37
Figura 8. Incubação com Thiamet G por 24 horas aumentou a expressão de O-GlcNAc em artéria aorta de camundongos C57BL/6	44
Figura 9. A expressão de OGT após incubação com Thiamet G em camundongos C57BL/6 por 24 horas, permaneceu inalterada, enquanto houve aumento na expressão de OGA.	45
Figura 10. O aumento da contração vascular de camundongos C57BL/6 tratados com Thiamet G diminui frente ao PD 98059, inibidor da ERK 1/2.	46
Figura 11. A expressão/atividade de ERK 1/2 se elevam frente o aumento de O-GlcNAc.	47
Figura 12. O aumento da contração vascular de camundongos <i>knockout</i> para IL-10 é prevenida pelo PD 98059, inibidor da ERK 1/2.	47
Figura 13. A expressão/atividade de ERK 1/2 se elevam na ausência de interleucina-10.	48
Figura 14. A atividade de STAT3 diminui frente ao aumento de O-GlcNAc, enquanto a expressão de JAK1 encontra-se aumentada.	49
Figura 15. Os níveis teciduais de IL-10 foram diminuídos após o aumento de O-GlcNAc.	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação dos anticorpos primários e secundários e suas diluições.	41
Tabela 2. Valores de $E_{máx}$ e pD_2 para contração de aortas torácicas de camundongos C57BL/6 induzidas por fenilefrina, após 24 horas de incubação com Thiamet G na presença ou ausência do inibidor da ERK 1/2, PD 98059.....	46
Tabela 3. Valores de $E_{máx}$ e pD_2 para contração de aortas torácicas induzidas por fenilefrina em camundongos <i>knockout</i> para IL-10, na presença e ausência do inibidor da ERK 1/2, PD 98059	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ang II: Angiotensina II
Ca²⁺: Íon cálcio
CH₃: Grupo Metil
CH₃CO: Grupo Acetila
CMLV: Células do Músculo Liso Vascular
DAG: diacilglicerol
DCNT: Doenças Crônicas Não Transmissíveis
DM: Diabetes *mellitus*
DM1: Diabetes *mellitus* tipo 1
DM2: Diabetes *mellitus* tipo 2
DOCA: Acetato de desoxicorticosterona
EDHF: Fator Hiperpolarizante Dependente de Endotélio
eNOS: sintase de óxido nítrico endotelial
ET-1: Endotelina-1
ERK 1/2: Cinase regulada por sinais extracelulares
Frutose-6-P: Frutose-6-fosfato
Glicose-6-P: Glicose-6-fosfato
GFAT: Glutamina: Frutose-6-fosfato aminotransferase
GlcNAc-6-P: N-acetil-glucosamina-6-fosfato
GlcNH₂-6-P: glucosamina-6-fosfato
H: Grupo Hidrogênio
IFN- γ : Interferon gama
IkB: Inibidor do fator nuclear kappa B
IL: Interleucina
IL-10R1: receptor 1 de interleucina-10
IL-10R2: receptor 2 de interleucina-10
JAK1: Janus cinase 1
MAPK: Proteína cinase ativada por mitógenos
MIF: Fator de inibição de macrófagos

MLC: miosina de cadeia leve
MLCK: Cinase das cadeias leves de miosina
MLCP: Fosfatase das cadeias leves de miosina
MKP-1: Fosfatase de proteína cinase ativada por mitógeno-1
MPTs: Modificações Pós-Traducionais
NF- κ B: Fator nuclear kappa B
NO: Óxido nítrico
OGA: O-GlcNAcase; β -N- acetilglucosaminidase
OGT: Uridina difosfo-N-acetil glucosamina; polipeptídeo β -N-acetilglucosaminil transferase; UDP-NAC transferase; O-GlcNAC transferase
OMS: Organização Mundial de Saúde
O-GlcNAc: O-glicosilação com N-acetil-glucosamina
PI3K: fosfatidilinositol 3-quinase
PIP2: fosfatidilinositol 4,5 – bifosfato
PKC: Proteína quinase C
PLC: Fosfolipase C
PO₄: Grupo Fosfato
ROCCs: Canais de cálcio operados por receptor
RS: Retículo sarcoplasmático
SERCA: Ca²⁺-ATPase do retículo sarcoplasmático
SOCCs: Canais para cálcio operados por estoques
STAT3: Proteína transdutora de sinal e ativação da transcrição
Th1: T helper 1
Th2: T helper 2
Th17: T helper 17
Treg: T regulatória
Tyk2: Tirosina cinase 2
UDP-GlcNAc: Uridina 5'-difosfato-N-acetil-glucosamina
VBH: Via da biossíntese da hexosamina
VOCCs: Canais para cálcio operados por voltagem

SUMÁRIO

1. REVISÃO DE LITERATURA	17
1.1. O-Glicosilação com N-Acetil-Glucosamina	18
1.2. Ação da O-GlcNAc sobre a vasculatura	21
1.3. Contração Vascular	24
1.3.1. Contração do Músculo Liso Vascular dependente da concentração de Ca^{2+}	24
1.3.2. Contração do Músculo Liso Vascular independente da concentração de Ca^{2+}	26
1.4. Via da ERK 1/2	28
1.5. Interleucina-10	29
1.5.1. IL-10 na Vasculatura	32
2. OBJETIVOS.....	35
2.1. Objetivo Geral.....	35
2.2. Objetivos Específicos	35
3. METODOLOGIA	36
3.1. Animais	36
3.2. Demonstração dos procedimentos experimentais	37
3.3. Remoção da artéria aorta	38
3.4. Procedimento <i>in vitro</i>	38
3.5. Reatividade vascular	38
3.6. Extração de proteínas	39
3.7. Quantificação de proteínas por ensaio de Bradford	39
3.8. <i>Western blot</i>	40
3.9. Teste de Citometria de Fluxo.....	42
3.10. Análise estatística.....	43
4. RESULTADOS	44
4.1. Aumento dos níveis de O-GlcNAc por Thiamet G e a expressão de OGT e OGA ...	44
4.2. Aumento de O-GlcNAc promovendo vasoconstrição via ERK 1/2	45
4.3. Papel endógeno da IL-10 nos efeitos vasculares mediados por ERK 1/2	47
4.4. O-GlcNAc na modulação da via de sinalização de IL-10	49
4.5. Efeito do aumento tecidual de O-GlcNAc nos níveis de IL-10.....	49

5. DISCUSSÃO.....	51
6. CONCLUSÕES.....	56
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
8. ANEXO.....	69

1. REVISÃO DE LITERATURA

As doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) são as principais causas de morbimortalidade no mundo, correspondendo a 72% das causas de mortes (BORBA; LEMOS; HAYASIDA, 2015). Entre as principais DCNT pode-se citar a hipertensão arterial, insuficiência cardíaca, diabetes *mellitus* (DM), acidente vascular cerebral, aterosclerose, síndromes metabólicas, insuficiência renal, entre outros. A fisiopatologia mais comum para esses problemas são as alterações vasculares, que vem se tornando cada vez mais foco de estudos (BORGES et al., 2009; SAFAR; BOUDIER, 2005).

A disfunção endotelial é uma das alterações vasculares mais significativas por resultarem em modificações no tônus vascular (CARVALHO; COLAÇO; FORTES, 2006). Este último é controlado pelas células do músculo liso vascular (CMLV), sendo capazes de responder à estímulos hormonais e hemodinâmicos. O estudo destas células é importante para o entendimento dos processos de sinalização que controlam o tônus vascular já que são altamente especializadas e expressam uma grande variedade de proteínas contráteis, canais iônicos e moléculas de sinalização (CAHILL; REDMOND, 2016; CAIRRÃO et al., 2009).

Dentre as substâncias que promovem a vasoconstrição pode-se citar fatores como a adrenalina e noradrenalina; neurotransmissores não adrenérgicos e não colinérgicos; angiotensina II (Ang II), vasopressina, entre outros; além dos fatores contráteis derivados do endotélio como a endotelina-1 (ET-1), tromboxano A₂, prostaglandinas D₂ e E₂. Como substâncias que promovem vasodilatação encontram-se neurotransmissores como a acetilcolina, os neurotransmissores não adrenérgicos e não colinérgicos e as cininas. Tem-se também o óxido nítrico, as prostaglandinas e o fator hiperpolarizante dependente de endotélio (EDHF), os quais são definidos como os fatores dependentes do endotélio envolvidos na vasodilatação (LIMA, 2012; VILA; SALAICES, 2005).

Além disso, há fatores intrínsecos como receptores, canais iônicos e moléculas de sinalização que estão relacionados com as alterações do tônus vascular. Estes fatores podem ser modulados por modificações pós-traducionais (MPTs), que se refere a adição ou remoção enzimática de resíduos de um grupamento químico em proteínas já sintetizadas. Essas modificações são reversíveis e podem promover alterações físico-químicas envolvendo interação com efetores, localização, estabilidade, agregação, entre outros (LIMA et al., 2012).

Existem vários tipos de MPTs, sendo as principais: a fosforilação (adição de um grupo fosfato – PO_4), acetilação (adição de um grupo acetila – CH_3CO), metilação (substituição de um grupo hidrogênio – H por um grupo metil – CH_3) e a glicosilação (adição de sacarídeos) (LIMA, 2012; YU et al., 2012). Dentre os tipos de glicosilação, as mais estudadas são a O-glicosilação, onde sacarídeos se ligam ao radical hidroxila das cadeias laterais de serina, treonina e tirosina da proteína e a N-glicosilação, onde carboidratos são ligados quimicamente ao nitrogênio das cadeias laterais da asparagina ou da arginina (VARKI et al., 2009).

1.1. O-Glicosilação com N-Acetil-Glucosamina

O sacarídeo utilizado pela O-glicosilação é o N-acetil-glucosamina, sendo essa modificação então chamada de O-glicosilação com N-acetil-glucosamina (O-GlcNAc). Esta modificação foi relatada pela primeira vez em 1984, sendo caracterizada pela adição enzimática de sacarídeos em sítios específicos de proteínas e lipídios (TORRES; HART, 1984). Até os dias atuais, quase mil proteínas citoplasmáticas e nucleares já foram relatadas como alvo das modificações por O-GlcNAc, sendo que tais modificações podem ser encontradas em quase todos os compartimentos intracelulares (HART et al., 2011; LUBAS; HANOVER, 2000; WELLS; VOSSELLER; HART, 2001; WELLS et al., 2002; TORRES; HART, 1984). Dentre estas proteínas incluem cinases, enzimas metabólicas, proteínas do citoesqueleto, fatores de transcrição e a classe de proteínas produzidas no estresse térmico, as chaperonas (ROGACKA et al., 2010).

O-GlcNAc está envolvida em processos de regulação do controle do ciclo celular, proteção contra estresse, localização subcelular de moléculas de sinalização e transcrição de genes (SLAWSON; HOUSLEY; HART, 2006). Além disso, permite o correto modelamento de proteínas; confere estabilidade, evitando a degradação de certas proteínas; colabora para a adesão celular; modula vias de sinalização intracelulares, podendo aumentar ou inibir sua atividade de acordo com o promotor e outras proteínas associadas (LIMA, 2012; SPIRO, 2002). Em vários aspectos, O-GlcNAc é similar a fosforilação de proteínas, podendo competir entre si pelo mesmo sítio de ligação proteico (HARTWECK; SCOTT; OLSZEWSKI, 2002). Entretanto, se diferem pelo fato da fosforilação ser controlada por diversas cinases e

fosfatases específicas, enquanto O-GlcNAc é controlada apenas por O-GlcNAc transferase (OGT; uridina difosfo-N-acetil glucosamina; polipeptídeo β -N-acetilglucosaminil transferase ou UDP-Nac transferase) e O-GlcNAcase (OGA; β -N- acetilglucosaminidase). A primeira enzima catalisa a adição de N-acetil-glucosamina no grupo hidroxila dos resíduos de serina, treonina ou tirosina das proteínas alvo e a segunda catalisa a remoção hidrolítica de O-GlcNAc das proteínas modificadas (**Figura 1**) (LIMA, 2012).

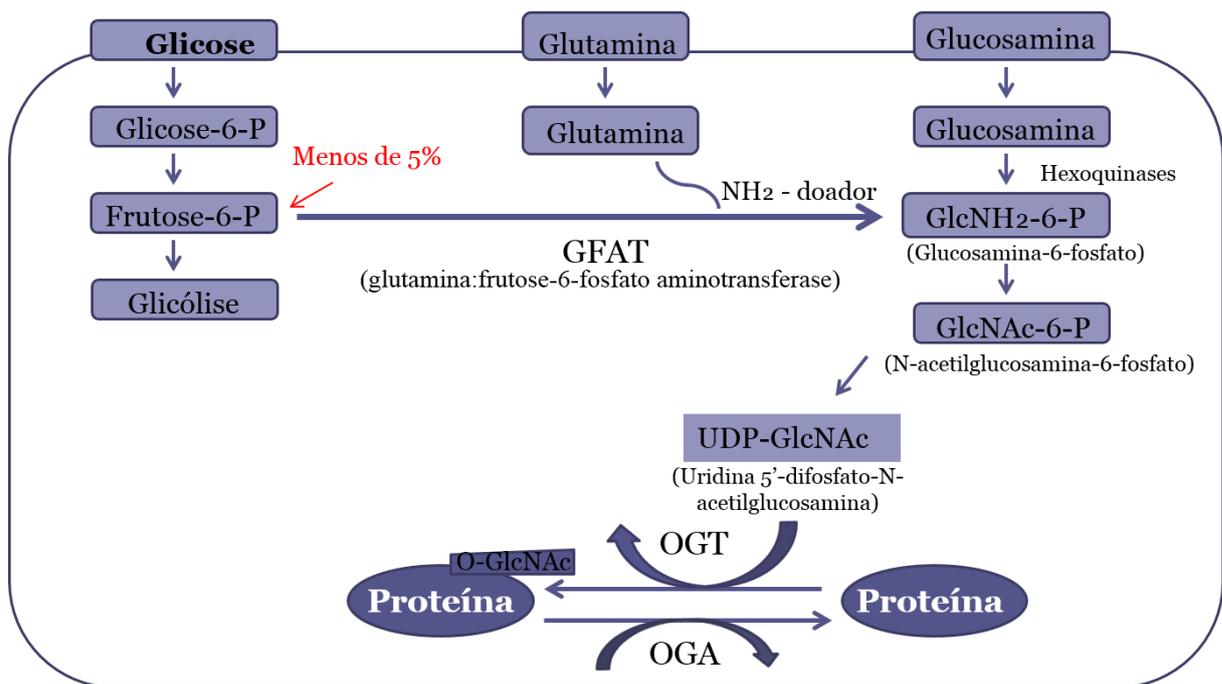


Figura 1. Via de Biossíntese de Hexosamina. Demonstração das enzimas envolvidas na formação de proteínas glicosiladas por O-GlcNAc a partir da síntese de UDP-GlcNAc. (Adaptado de Lima et al, Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2011).

O gene da OGT em humanos encontra-se no cromossomo X (Xq13.1) (SHAFI et al., 2000). Ela é uma proteína solúvel encontrada preferencialmente no núcleo, podendo estar presente também no citosol e em mitocôndrias (LUBAS; HANOVER, 2000). Pode possuir três isoformas, duas subunidades de 110 kDa e uma subunidade de 78 kDa (LAZARUS; LOVE; HANOVER, 2006; LUBAS; HANOVER, 2000). Estudos em *knockout* revelam que a falta de O-GlcNAc leva a perda da função da célula, se referindo ao fato de OGT viabilizar células-tronco embrionárias, assim, sua ausência resulta em morte (O'DONNELL et al., 2004).

A enzima OGT adiciona a porção de açúcar em proteínas alvo, utilizando Uridina 5'-difosfato-N-acetil-glucosamina (UDP-GlcNAc) que é um produto final de alta energia

sintetizado através da via da biossíntese da hexosamina (VBH) (**Figura 1**), com sua enzima limitante da velocidade Glutamina: frutose-6-fosfato aminotransferase (GFAT). Cerca de 2-5% do total da glicose é metabolizado pela VBH. Esta via compartilha seus dois primeiros passos com a glicólise, iniciando-se com a hexoquinase fosforilando glicose produzindo glicose-6-fosfato (Glicose-6-P), que é então convertida em frutose-6-fosfato (Frutose-6-P). As vias se divergem, uma sendo encaminhada para glicólise e outra, que por meio de GFAT, irá converter frutose-6-fosfato utilizando glutamina como doadora do grupamento amino em glucosamina-6-fosfato (GlcNH₂-6-P), que posteriormente é convertida em N-acetil-glucosamina-6-fosfato (GlcNAc-6-P) e por fim, se converte em UDP-GlcNAc (SLAWSON; COPELAND; HART, 2010). OGT é controlada pelos níveis celulares de UDP-GlcNAc do citosol e do núcleo, servindo como um sensor de nutrientes, promovendo alterações rápidas no nível de O-GlcNAc (ZHANG et al., 2014; ZACHARA et al., 2004; KREPPEL; HART, 1999).

O gene da enzima OGA está localizado no cromossomo 10q24.1-q24.3 [62]. Sua localização é principalmente no citosol, possuindo duas isoformas distintas de 130 kDa (OGA longa) e 75 kDa (OGA curta), diferindo pelo C-terminal (LIMA et al., 2011). A análise de fracionamento celular mostrou que a isoforma “OGA longa” se localiza predominantemente no citoplasma, enquanto “OGA curta” se encontra no núcleo (WELLS; WHELAN; HART, 2003; COMTESSE; MALDENER; MEESE, 2001; WELLS; VOSSELLER; HART, 2001). O polimorfismo de um único nucleotídeo no gene MGEA5 da OGA tem sido associado com o desenvolvimento de diabetes tipo II em uma população mexicana (LEHMAN et al., 2005).

Na maioria das células, a OGT é encontrada principalmente no interior do núcleo, e a OGA é predominante dentro do citosol. No entanto, ambas as enzimas são encontradas em todos os compartimentos intracelulares e pouco se sabe sobre a regulamentação do seu tráfego intracelular. Embora a OGT seja principalmente nuclear, ela é excluída do nucléolo, e a OGA que é expressa principalmente no citosol, é altamente encontrada dentro do nucléolo (HART et al., 2011).

Inibidores potentes e seletivos de OGA foram desenvolvidos nos últimos anos, graças à disponibilidade de ensaios enzimáticos de alto rendimento, capazes de identificar tanto suas estruturas como seus mecanismos (KIM, 2011). Já em relação ao desenvolvimento de inibidores eficazes para OGT, os estudos ainda são limitados, já que dentre o número

reduzido de inibidores descritos na literatura, alguns não são comercializados ou não foram bem caracterizados, podendo apresentar algum grau de toxicidade (NGOH et al., 2010).

1.2. Ação da O-GlcNAc sobre a vasculatura

A homeostase de O-GlcNAc é essencial para a função celular normal e seus níveis devem estar dentro de uma faixa estreita, pois pequenas mudanças podem levar a efeitos deletérios (ASADULLAH; STERRY; VOLK, 2003). O aumento de O-GlcNAc é particularmente relevante em doenças crônicas como DM, doenças cardiovasculares, desordens neurodegenerativas e câncer (VARKI et al., 2009).

A O-Glicosilação aumentada pode ter sua significância na vasculatura, fato justificado pela sua capacidade de interferir nos mecanismos constritores e dilatadores, promovendo um funcionamento anormal da regulação da resistência periférica total o que leva a um aumento da pressão arterial e perfusão anormal de órgãos. Além disso, muitas vezes simultaneamente com hipertensão, há DM. Tal relação pode ocorrer já que nas anormalidades metabólicas relacionadas a resistência insulínica e diabetes *mellitus*, os níveis de O-GlcNAc se encontram elevados (LIMA et al., 2011).

Há proteínas contráteis importantes que são alvo de O-Glicosilação, dentre elas pode-se citar a proteína quinase C (PKC), que promove a fosforilação da enzima CPI-17, responsável por inibir a miosina fosfatase, prolongando assim a fosforilação da miosina de cadeia leve (MLC) que conseqüentemente vai permitir a interação actina-miosina, resultando na contração (NUNES; RIGSBY; WEBB, 2010; BUDZYN et al., 2006; WOODSOME et al., 2001). Tem-se também interferência por O-GlcNAc diminuindo a expressão de SERCA (Ca²⁺-ATPase do retículo sarcoplasmático), que se encontra na membrana do retículo sarcoplasmático e é capaz de promover o retorno do cálcio do citosol para o interior do retículo (FEITOSA, 2012; HART et al., 2011; PEREZ-ZOGHBI et al., 2009).

Outro alvo de O-GlcNAc é a enzima fosfolipase C (PLC), que é específica para o lipídio de membrana fosfatidilinositol 4,5 – bifosfato (PIP₂) que catalisa a formação de dois potentes segundos mensageiros: IP₃ e 1,2 – diacilglicerol (DAG) (HALL et al., 2006). O DAG por sua vez, ativa juntamente com o cálcio a PKC que fosforila proteínas específicas,

promovendo a contração (WEBB, 2003). Além disso, a fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) que atua na fosforilação do fosfatidilinositol presente nas membranas celulares também sofre alteração por O-glicosilação (LIMA, 2012).

O-GlcNAc elevada estimula a expressão do gene da angiotensina II, importante vasoativo envolvido na vasoconstrição (HSIEH et al., 2002). Vias de sinalização importantes como a das proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs), p38 e cinase regulada por sinais extracelulares (ERK 1/2), foram relatadas sofrerem fosforilação em resposta ao aumento de O-GlcNAc (LACZY et al., 2009; KNEASS; MARCHASE, 2005). Além destas, a quinase RhoA/Rho quinase também podem ser reguladas por esta MPT. Quando ativada, esta via favorece a contração por meio da inibição da miosina fosfatase, permitindo assim a interação da actina com a miosina (LIMA, 2012). Esta modificação não só modula muitas respostas celulares como também desempenha um papel importante na função anormal de cinases envolvidas na disfunção vascular (LIMA; TOSTES, 2012).

Conseqüentemente, níveis aumentados de O-GlcNAc na vasculatura aumentam a reatividade vascular aos estímulos contráteis e diminuem a vasodilatação dependente do endotélio, o que está associado à modificação da O-GlcNAc na sintase de óxido nítrico endotelial (eNOS) (LIMA et al., 2009, LIMA et al., 2008). Em condições de hiperglicemia, a eNOS, responsável pela produção de óxido nítrico (NO), pode ser modificada por O-GlcNAc. Essa modificação ocorre por meio da O-Glicosilação da Akt, proteína cinase responsável pela fosforilação de eNOS para produção de óxido nítrico, que ao ser alterada perde a capacidade de ativar eNOS. Sendo assim, a diminuição da fosforilação de eNOS reduz sua atividade em cerca de 67%, interferindo nos níveis de NO (LIMA et al., 2009; FEDERICI et al., 2002; DU et al., 2001). A menor biodisponibilidade do NO dificulta a promoção da vasodilatação, o comprometimento da agregação plaquetária e contribui para o aumento do estresse oxidativo (NGOH et al., 2010). O dano crônico na eNOS tem sido associado, por exemplo, ao aumento da aterosclerose em pacientes diabéticos (ZACHARA; HART, 2004). Não é apenas em meio hiperglicêmico que a atividade da eNOS é prejudicada, em condições de hipertensão arterial, esta se encontra diminuída, enquanto O-GlcNAc apresenta aumento (LIMA et al., 2012).

A modificação por O-GlcNAc também está relacionada com a modulação do processo inflamatório, importante no desenvolvimento das alterações vasculares. Os níveis aumentados de O-GlcNAc são capazes de aumentar a quimiotaxia tanto induzida por agonista, quanto em ausência de estímulos (LIMA et al., 2009). A ativação de linfócitos T em proteínas nucleares

e citoplasmáticas ativam dinamicamente a O-GlcNAc, mostrando a importância dessa modificação na fase de ativação da resposta imune (BANERJEE; LAGERLÖF; HART, 2016). Também é capaz de modificar o fator nuclear kappa B (NF-kB) ligando-se diretamente a OGT, causando sua translocação para o núcleo, ativando a expressão de interleucina-6, TNF- α e VCAM-1 (GOLKS et al., 2007). Ao ser O-glicosilado, o NF-kB reduz a interação com o inibidor do fator nuclear kappa B (I κ B) causando maior expressão de citocinas pró-inflamatórias (YANG et al., 2008).

O aumento de O-GlcNAc interfere no funcionamento de diversas atividades do organismo. Proteínas responsáveis pelo recrutamento de neutrófilos quando modificadas por O-GlcNAc têm sua capacidade de indução aumentada (KNEASS; MARCHASE, 2004, 2005). A hiperexpressão de OGT em músculo e tecido adiposo resulta na hiperleptinemia em ratos, caracterizada quando receptores de leptina sofrem alteração causando resistência a ela. A leptina é uma proteína secretada por adipócitos que age no sistema nervoso central, controlando a ingestão de alimentos (MCCLAIN et al., 2002; EMILSSON et al., 2001; CONSIDINE et al., 2000).

A superexpressão de GFAT na musculatura esquelética e no tecido adiposo de camundongos transgênicos desenvolvem resistência à insulina (HEBERT et al., 1996; LIMA, 2012). O-glicosilação no substrato para receptores de insulina reduz a interação destes com a enzima PI3K, bloqueando a via de sinalização da insulina (FEDERICI et al., 2002; VOSSELLER et al., 2002). Níveis elevados de O-GlcNAc bloqueiam o efeito neuroprotetor da insulina, além de aumentar a susceptibilidade a apoptose em células beta pancreáticas (ZHANG et al., 2004).

Por outro lado, este aumento de O-Glicosilação também está associado com atividade anti-inflamatória, aumentando a tolerância ao estresse. Em condições de estresse agudo, o aumento de O-GlcNAc eleva a sobrevivência dos cardiomiócitos, reduzindo os níveis circulantes de TNF- α , NF-kB, IL-6 e ICAM-1, melhorando assim a função cardíaca (LIMA et al., 2012).

As características cardioprotetoras durante o estresse agudo não ocorrem na exposição crônica, contribuindo para a disfunção. Meios hiperglicêmicos que são acompanhados do aumento de O-GlcNAc apresentam maior expressão de OGT, prolongando a saída de Ca⁺ do retículo sarcoplasmático, levando a uma disfunção dos cardiomiócitos (CLARK et al., 2003; HU et al., 2005). Em animais diabéticos ou em cardiomiócitos normais incubados com glucosamina ou meio hiperglicêmico há alteração nos mecanismos de excitação do miocárdio,

diminuindo a atividade da SERCA, ocorrendo menor relaxamento (LIMA, 2012). Sendo assim, O-Glicosilação aumentada em condições agudas pode promover uma melhora na condição fisiológica; enquanto, seu aumento crônico causa efeitos patológicos (LIMA et al., 2009).

A modificação por O-GlcNAc está presente em vários tecidos e interfere em diversas proteínas envolvidas na transcrição, sinalização e função cardiovascular (LIMA et al., 2009). Estudos mostram que ratos hipertensos por acetato de desoxicorticosterona (DOCA) possuem aumento de O-GlcNAc e da reatividade vascular para estímulos contráteis tanto em artérias de resistência (mesentérica) como de condutância (aorta) (LIMA et al., 2009, 2008). Apesar do seu envolvimento na regulação da função de várias proteínas, mais estudos são necessários para avaliar se os impactos do aumento de O-GlcNAc interferem na função vascular.

1.3. Contração Vascular

1.3.1. Contração do Músculo Liso Vascular dependente da concentração de Ca^{2+}

O músculo liso vascular apresenta cinases e fosfatases que controlam processos de fosforilação responsáveis pela atividade contrátil e sensibilização ao cálcio (Ca^{2+}). As proteínas reguladoras importantes na contração são a cinase das cadeias leves de miosina (MLCK), a fosfatase das cadeias leves de miosina (MLCP), a calmodulina, a caldesmona e a calponina (CLARK; PYNE-GEITHMAN, 2005).

O processo de contração é iniciado por meio de um sinal elétrico, químico ou hormonal. Ocorre através da ativação de receptores específicos presentes na superfície das células, por transdução de sinal e/ou por canais iônicos (FEITOSA, 2012). O cálcio (Ca^{2+}) necessário para que haja contração pode ter origem do meio extracelular, adentrando o meio intracelular pelo canal de Ca^{2+} e/ou oriundos dos estoques do retículo sarcoplasmático (RS) (MCCARRON et al., 2004).

O Ca^{2+} extracelular flui para o meio interno por diversos mecanismos, sendo eles: a despolarização da membrana, resultando em sua entrada via canais para cálcio operados por voltagem (VOCCs) (JANSSEN et al., 2001), canais de cálcio operados por receptor (ROCCs) (YAMAKAGE et al., 2001), canais catiônicos não seletivos como os canais para cálcio

operados por estoques (SOCCs) (SETOGUCHI et al., 1997); e por mecanismo que não depende de alteração do potencial de membrana, ocorrendo através da ativação de um receptor de membrana por um agonista (BERGNER; SANDERSON, 2002). Frequentemente os receptores de membrana estão acoplados a uma proteína G que atua como reguladora de muitas atividades intracelulares (VARKI et al., 2009).

A atividade contrátil do músculo liso vascular está relacionada com a estrutura e organização dos seus filamentos de actina e miosina. Há diversos tipos de filamentos onde se encontram as proteínas envolvidas neste processo. Os filamentos finos são compostos por actina e tropomiosina que estão envolvidas na interação com moléculas de miosina II, além de caldesmona e calponina que se ligam a actina bloqueando o local de ligação à miosina. Os filamentos grossos são compostos por miosina e sua fosforilação é o principal fator que regula a contração do músculo liso (ROD; STEPHENS; TATE, 2003; ROSS; KAYE; PAWLINA, 2003; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999).

No meio intracelular, como o músculo liso não expressa troponina, o Ca^{2+} liga-se a calmodulina, formando o complexo cálcio-calmodulina (4 íons de cálcio + calmodulina). Esse complexo é capaz de ativar a MLCK, que por sua vez fosforila as cadeias leves de miosina, aumentando a atividade da ATPase da miosina ativada por actina que hidrolisam ATP, permitindo a ligação actina-miosina, resultando em contração (**Figura 2**) (MARIANA, 2013).

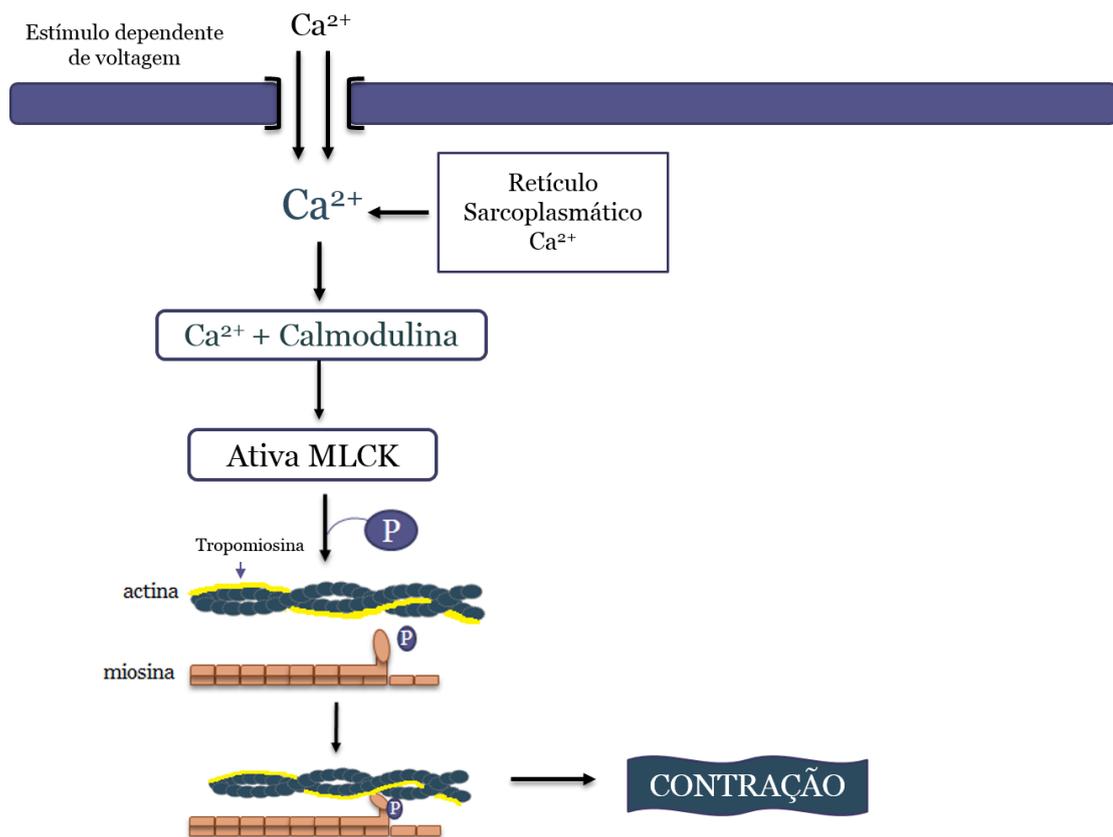


Figura 2. Contração do músculo liso vascular dependente da concentração de Ca^{2+} . O aumento de cálcio intracelular seja pela entrada no canal de Ca^{2+} ou pela liberação do retículo sarcoplasmático forma o complexo $\text{Ca}^{2+} + \text{calmodulina}$. Este complexo ativa a cinase de cadeia leve de miosina (MLCK) que fosforila as cadeias leves de miosina, permitindo a interação actina-miosina e promovendo a contração (Adaptado de WEBB, 2003).

1.3.2. Contração do Músculo Liso Vascular independente da concentração de Ca^{2+}

Durante a estimulação contínua, há uma redução gradual da concentração de Ca^{2+} intracelular, porém, a contração é mantida. Tal fato é explicado por mecanismos contráteis independentes dos níveis de Ca^{2+} , caracterizado pelo aumento da sensibilização ao cálcio frente a seus níveis constantes (KARAKI et al., 1997; XIONG; SPERELAKIS, 1995). Existem agonistas capazes de provocar contração por estes mecanismos. Essa sensibilização ao Ca^{2+} envolve principalmente a inibição da atividade da MLCP (SOMLYO; SOMLYO, 2003). Quando está ativada, a MLCP é responsável por desfosforilar a cadeia leve de miosina, desligando a interação actina-miosina (WEBB, 2003). Ao ser inibida, tal atividade regulatória não acontece e o processo contrátil se prolonga. Duas vias principais fazem o uso dessa estratégia: a via da RhoA/Rho cinase e a via da PKC (MIZUNO et al., 2008).

O presente estudo tem como foco a via independente da concentração de cálcio denominada cinase regulada por sinais extracelulares, a ERK 1/2. Esta via interfere em outras proteínas reguladoras da contração: a caldesmona e a calponina (JE et al., 2001; ROKOLYA; SINGER, 2000; LEINWEBER et al., 1999). A caldesmona é uma proteína de ligação à actina, possui quatro domínios na sua estrutura e locais de ligação para miosina, actina, tropomiosina e Ca^{2+} + Calmodulina (ALAHYAN et al., 2006). O C-terminal do domínio 4 é o responsável pelas propriedades inibitórias da ATPase em que, na ausência de cálcio ou de calmodulina, interage fortemente com a actina e inibe a atividade da actina-miosina ATPase (amATPase), não ocorrendo a ligação entre actina e miosina (GUSEV, 2001). Já a calponina possui diversas isoformas, sendo a α -calponina (calponina básica) a mais abundante no músculo liso. Ela interage com a actina, tropomiosina, miosina e calmodulina, e tem capacidade de inibir a atividade da Mg-ATPase da actomiosina, impedindo assim como a caldesmona, a interação actina-miosina (GUSEV, 2001; STULL, 2001). A ERK 1/2 é capaz de fosforilar a caldesmona e a calponina. Ao serem fosforiladas, perdem seu efeito inibitório da ligação de actina com miosina, permitindo a contração (**Figura 3**) (JE et al., 2001; ROKOLYA; SINGER, 2000; LEINWEBER et al., 1999). Além disso, ela também medeia a fosforilação da MLCK, o que aumenta a sua atividade (ROSKOSKI, 2012).

Um estudo em transmissões sinápticas demonstrou que esta via é ativada pelo aumento de O-GlcNAc (TALLENT et al., 2009). Tal fato sugere a importância de verificar-se uma possível relação entre as alterações na contração vascular por mecanismo dependente da atividade da via da ERK 1/2.

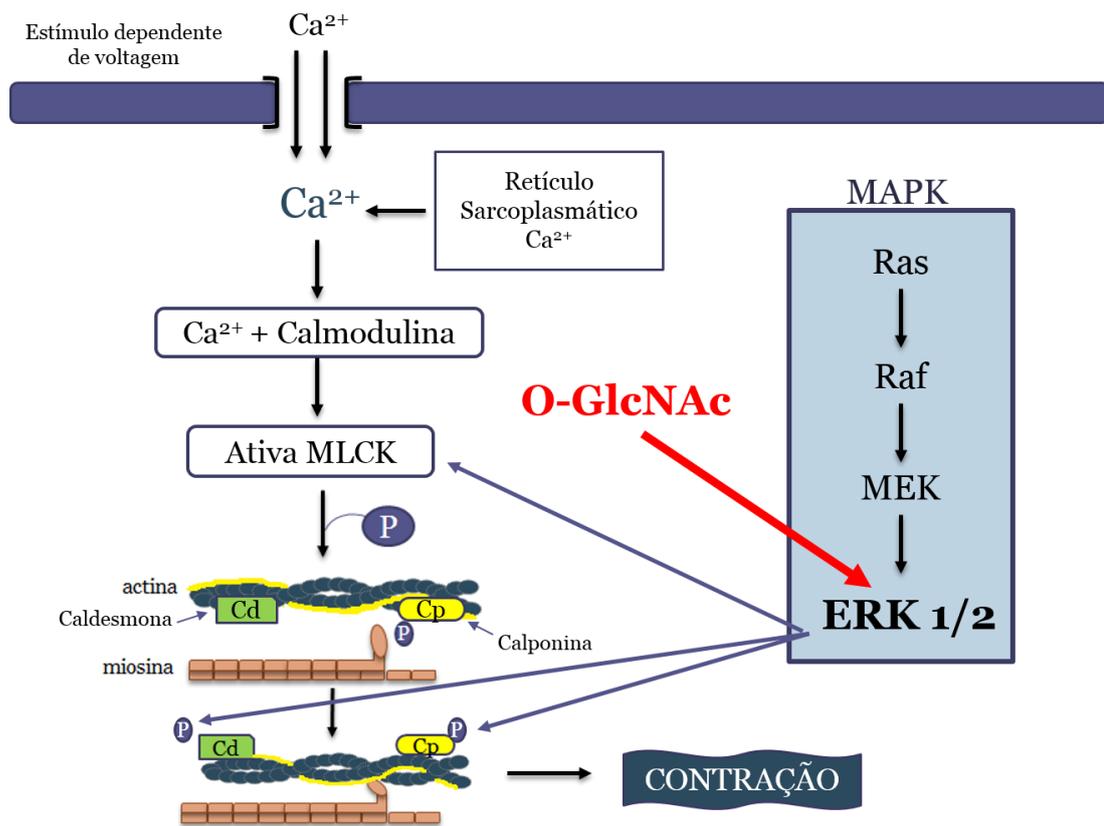


Figura 3. Contração do músculo liso vascular independente da concentração de Ca^{2+} via ativação de ERK 1/2. Mesmo em níveis intracelulares reduzidos de cálcio, a contração é mantida. Uma das vias envolvidas nesta contração é a via da ERK 1/2 por meio da fosforilação das proteínas regulatórias caldesmona e calponina. Ao serem fosforiladas elas perdem a capacidade inibitória através do seu deslocamento no filamento de actina, não podendo mais impedir a ligação de actina com miosina. Há uma possível ativação desta via frente o aumento de O-GlcNAc (Adaptado de WEBB, 2003).

1.4. Via da ERK 1/2

A ERK 1 e ERK 2 fazem parte da família das MAPKs, são cinases de resíduos de serina/treonina. Por terem 84% de sequências idênticas e compartilharem praticamente todas as funções, são então comumente chamadas de ERK 1/2 (ROSKOSKI, 2012). Ela pode ser ativada por uma grande variedade de estímulos incluindo sinais de crescimento, agentes vasoativos, citocinas, estresse oxidativo, funcionando como uma cascata de transdução de sinal extracelular (ROSKOSKI, 2012; KHAN et al., 2004). A ativação de ERK 1/2 ocorre pela cascata de sinalização Ras-Raf-MEK-ERK (**Figura 3**), participando da regulação de uma grande variedade de processos incluindo a adesão celular, progressão do ciclo celular,

migração e sobrevivência celular, diferenciação, metabolismo, proliferação e transcrição (WORTZEL; SEGER, 2011).

Essa cascata de sinalização é desregulada em doenças como a lesão cerebral, câncer, hipertrofia cardíaca, diabetes *mellitus* e inflamação (KIM, 2011). A ERK 1/2 fosforila substratos tanto em compartimentos celulares citoplasmáticos como nucleares. A ativação de tirosina-quinase de MEK está envolvida na via de transdução de sinal de angiotensina II (Ang II) e endotelina-1 (ET-1), dois conhecidos indutores da contração de aorta torácica. Em presença de um inibidor de ERK 1/2 (PD98059) as alterações de contração do músculo liso vascular resultante das ações de Ang II e ET-1 são normalizadas (ISHIHATA; TASAKI; KATANO, 2002).

Além da sua atividade na contração via inibição da atividade de caldesmona e calponina, ERK 1/2 ativa outra via de contração independente da concentração de Ca^{2+} , a via de RhoA/Rho cinase. ERK 1/2 fosforila diretamente RhoA e esta interação é dependente do local de ancoragem de ERK (D local) na extremidade C-terminal de RhoA (TONG et al., 2016). Quando Rho cinase está inibida, ocorre redução de contração induzida por fenilefrina (agonista α -adrenérgico) em ratos hipertensos (LIMA et al., 2016). Além disso, ocorre inibição da liberação de IL-2, IL-4, IL-5 e IFN- γ de células T periféricas ativadas em indivíduos normais (AIHARA et al., 2003).

1.5. Interleucina-10

A interleucina-10 (IL-10) é uma citocina tolerogênica (MOORE et al., 2001) e com ação anti-inflamatória (MOSSER; ZHANG, 2008). Foi originalmente identificada por Mosmann e colegas, possui peso de 37 kDa, se estende por cerca de 4,7 kb no cromossoma 1q21-32 e contém cinco éxons que são separados por quatro íntrons (MOSSER; ZHANG, 2008; MOORE et al., 1990; FIORENTINO; BOND; MOSMANN, 1989). Tem no total 178 aminoácidos, sendo 160 aminóácidos com segmentos maduros e 18 aminoácidos em sequência de sinal. Também é pioneira de uma família de citocinas denominadas do tipo II que incluem IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, IL-28 e IL-29 (MANNINO et al., 2015; COMMINS; STEINKE; BORISH, 2008). Todas estas citocinas possuem organização genômica de íntrons e éxons semelhantes, ligam-se a receptores com estruturas similares,

ativam a mesma cinase no receptor e possuem o mesmo fator de transcrição (DONNELLY et al., 2004). Apesar disso, diferem quanto à sua atividade biológica, que é determinada pela célula onde é originada, pelas células responsivas a elas e pela condição do meio em que são liberadas (MOSSER; ZHANG, 2008).

As principais produtoras de IL-10 são as células T helper 1 (Th1), T helper 2 (Th2), T regulatória (Treg) e T helper 17 (Th17). Também podem ser produzidas por células T CD8⁺, monócitos, macrófagos, células dendríticas, entre outros (MA et al., 2016; FILLATREAU; GRAY; ANDERTON, 2008). A sinalização de IL-10 inicia-se através da ligação ao seu complexo de receptores, denominados receptor 1 (IL-10R1) e receptor 2 (IL-10R2) (PUTOCZKI; ERNST, 2015). O receptor IL-10R1 está localizado no cromossomo humano 11 e possui elevada afinidade à IL-10, se ligando especificamente, permitindo assim uma mudança conformacional que possibilita a oligomerização com a IL-10R2 que se localiza no cromossomo 21 (SAXENA et al., 2015; YOON et al., 2006). Enquanto IL-10R2 é amplamente expresso, IL-10R1 é restrito para leucócitos e órgãos linfoides, com níveis elevados em monócitos e macrófagos (WU et al., 2009).

A ligação desta citocina ao seu receptor ativa as enzimas janus cinases 1 (JAK1) e tirosina cinase 2 (Tyk2), associada à porção citoplasmática dos receptores transmembranares. Uma vez ativadas, estas cinases fosforilam resíduos de tirosina específicos no domínio intracelular do receptor, servindo como local de ancoragem temporária para o fator de transcrição proteína transdutora de sinal e ativação da transcrição (STAT3). Ao se ligar, STAT3 é fosforilado em resíduos de serina e tirosina, sendo essa dupla fosforilação necessária para sua ativação completa. STAT3 fosforilado transloca-se para o núcleo onde desencadeia a ativação de vários genes responsivos a IL-10, que, por sua vez, suprimem a expressão de genes pró-inflamatórios (**Figura 4**) (HUTCHINS; DIEZ; MIRANDA-SAAVEDRA, 2013; MURRAY, 2007; WILLIAMS et al., 2004; FINBLOOM; WINESTOCK, 1995).

A sinalização de IL-10 pode ocorrer por outros STATs, como o STAT1 e STAT5, porém, STAT3 é o mais proeminente (OSEGUERA; SPENCER, 2014). Além disso, STAT3 desencadeia outra via de sinalização oposta aos efeitos de IL-10, como a via pró-inflamatória da IL-6. Tal característica deve-se ao fato da duração da ativação de STAT3 ser determinante para os seus efeitos finais. Na estimulação de IL-6, STAT3 tem uma ativação transitória, enquanto na sinalização de IL-10 produz uma resposta mais sustentada (MANNINO et al., 2015; BRAUN; FRIBOURG; SEALFON, 2013).

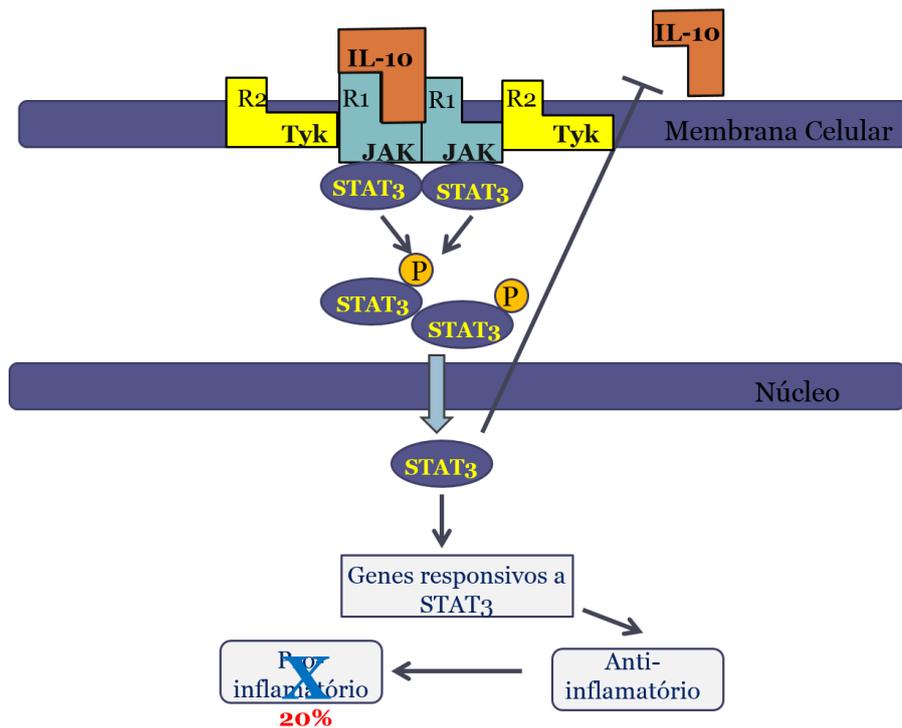


Figura 4. Via de Sinalização de Interleucina-10. A ligação da interleucina-10 ao seu receptor ativa a fosforilação do fator de transcrição STAT3 que migra para o núcleo ativando genes responsivos a IL-10. Estes genes inibem cerca de 20% dos genes pró-inflamatórios, sendo suficiente para uma resposta anti-inflamatória eficaz (Adaptado de Hutchins, 2013).

A IL-10 vem sendo foco de estudos devido aos seus efeitos pleiotrópicos, que, muitas vezes são contraditórios (MANNINO et al., 2015). O efeito principal da IL-10 é manter o estado homeostático, limitando a ativação das respostas imunológicas inatas e adaptativas (MA et al., 2016). A atividade anti-inflamatória de IL-10 em macrófagos manifesta-se com inibição da transcrição de 20% dos genes pró-inflamatórios, incluindo mediadores inflamatórios, receptores de superfície celular, quimiocinas e citocinas (HUTCHINS; DIEZ; MIRANDA-SAAVEDRA, 2013). Além disso, inibe a apresentação de antígeno, a proliferação de células T específica de antígeno, regula a apoptose, crescimento e diferenciação de células B, suprime diretamente Th1 e indiretamente Th2, inibe a ativação de monócitos/macrófagos (ASADULLAH; STERRY; VOLK, 2003; GUNNETT et al., 1999). Frente a deficiência do fator de transcrição STAT3 a sinalização de IL-10 não ocorre, verificando-se uma resposta exacerbada de Th1, aumentando assim a produção de IL-12 e IL-1 α (HUTCHINS; DIEZ; MIRANDA-SAAVEDRA, 2013).

A regulação da expressão de IL-10 é considerada complexa, podendo ser regulada tanto a nível de transcrição quanto de pós-transcrição (MANNINO et al., 2015). Possui meia-vida curta (2,7 a 4,5 horas) e um curto intervalo de atividade, sua atividade varia de acordo com a fonte celular que a originou, o momento da secreção e o tipo de célula que possui seus receptores; podendo melhorar ou exacerbar as respostas imunes (GEGINAT et al., 2016; SAXENA et al., 2015). Devido a essas características, as tentativas de aumentar IL-10 por infusão exógena não tiveram resultados satisfatórios (SAXENA et al., 2015). Recentemente, seu papel regulatório tem se destacado, sendo associado ao controle das respostas imunes e tolerância in vivo (MOORE et al., 2001; SABAT et al., 2010). A secreção de IL-10 pelas células T *helper* é importante tanto na sua autorregulação quanto na regulação por meio de T *regs* de vários subconjuntos de T CD4⁺, incluindo Th1 e Th17 (CHAUDHRY et al., 2011).

As principais secretoras de Treg são a IL-10 e o fator de transformação do crescimento beta (TGF- β). Suas funções moduladoras das células imunes podem contribuir para o *diabetes mellitus* tipo 1 (DM1), porém, esta relação não possui estudos consistentes (QIAO et al., 2016). Sua capacidade de promover respostas de células T citotóxicas também são relevantes no DM1. Além disso, tem seu papel nas respostas antitumorais (GEGINAT et al., 2016). Sua participação na patogênese e desenvolvimento do tumor é controverso, já que alguns estudos indicam que IL-10 age promovendo o crescimento do tumor, enquanto outros demonstram sua contribuição para a supressão da angiogênese e metástase (MANNINO et al., 2015).

1.5.1. IL-10 na Vasculatura

Desde 1999, um estudo de Gunnett já demonstrava a necessidade de elucidar-se o papel da IL-10 em vasos sanguíneos. Dados recentes demonstraram avanços, porém, novas pesquisas precisam ser desenvolvidas. A produção endógena de IL-10 pode fornecer um mecanismo de retroalimentação negativa que limita a resposta pró-inflamatória (GUNNETT et al., 1999). Tal fato pode ser observado em camundongos com ausência de IL-10 (*knockout* para IL-10), que em resposta a lipopolissacarídeos apresentam maiores níveis séricos de TNF- α , interferon- γ e aumento da expressão de mRNA para iNOS, que é a isoforma da enzima NOS induzida por estímulo imunológico ou inflamatório (GUNNETT et al., 1999; TAKAYASU et al., 1994). IL-10 é capaz de diminuir as espécies reativas de oxigênio e

nitrogênio (HADDAD; FAHLMAN, 2002); atenua a expressão de moléculas de adesão como I-CAM, V-CAM em células endoteliais, dificultando a ligação à monócitos (MOSTAFA et al., 2001). Além disso, pode inibir a expressão de iNOS (GUNNETT et al., 1999).

A IL-10 tem papel anti-aterogênico (THUSEN et al., 2003), sendo encontrada em placas de ateroma com provável papel ativo na redução do meio inflamatório da parede do vaso (TEDGUI; MALLAT, 2001). Este papel foi comprovado ao se investigar que camundongos *knockout* para IL-10 que apresentaram um processo aterosclerótico acelerado (PINDERSKI et al., 1999). Ao submeter estes animais a uma dieta aterogênica, constatou-se um aumento significativo no acúmulo de lipídeos, além do aumento de lesões quando comparados aos camundongos controle (GUNNETT et al., 1999). Níveis séricos de IL-10 encontram-se baixos em pacientes com angina aguda (SMITH et al., 2001).

A atividade de IL-10 está relacionada com a neutralização da disfunção endotelial induzida por angiotensina II, endotelina-1 e lipossacarídeos, que são substâncias vasoativas bem elucidadas, capazes de promover vasoconstrição. Demonstrou-se que IL-10 aumenta o relaxamento por meio da inibição da NADPH oxidase em ratos hipertensos induzidos por Ang II (KASSAN et al., 2011). Ang II também tem sua ação relatada na disfunção vascular associada com a ativação da via de sinalização de RhoA/Rho cinase (LIMA et al., 2016). Na presença de endotelina-1 a via da ERK 1/2 é ativada, desencadeando estresse oxidativo, inflamação, remodelamento, ou seja, ações que promovem mudanças na reatividade vascular (DAOU; SRIVASTAVA, 2004; ISHIHATA; TASAKI; KATANO, 2002; GUNNETT et al., 1999). IL-10 é capaz de diminuir a sinalização da família das MAPK como a p38 e a ERK 1/2. Grande parte das ações de IL-10 estão associadas com a inibição da atividade de ERK 1/2 e RhoA/Rho cinase (LIMA et al., 2016; GIACHINI et al., 2009). Estudos com camundongos *knockout* e transgênicos para IL-10 mostraram que o aumento desta interleucina é protetora, enquanto a sua ausência é deletéria para a resposta vascular (GIACHINI et al., 2009; GUNNETT et al., 1999).

Baseado nos dados apresentados, a hipótese de trabalho foi elaborada a fim de elucidar se a *O*-GlcNAc promove a inibição das proteínas da cascata JAK1/STAT3/IL-10, diminuindo as ações protetoras da IL-10 na vasculatura, resultando no aumento da ativação da ERK 1/2, favorecendo assim a disfunção vascular (**Figura 5**).

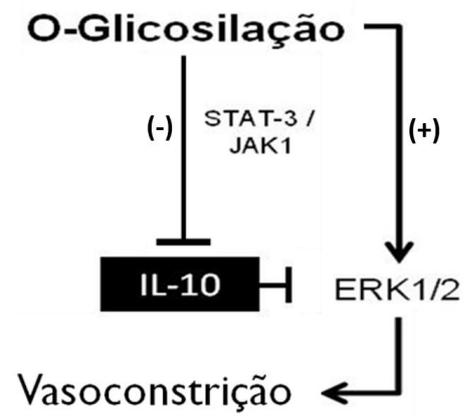


Figura 5. Hipótese de Trabalho. O aumento da *O*-GlcNAc promove a inibição direta, ou via JAK1, da STAT3 diminuindo assim a concentração e as ações da IL-10, resultando em um aumento da fosforilação/ativação da ERK 1/2, favorecendo a disfunção vascular.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Verificar se a *O*-glicosilação com N-acetil-glucosamina (*O*-GlcNAc) promove alteração na vasoconstrição por mecanismos moduladores da ERK 1/2 via IL-10.

2.2. Objetivos Específicos

1. Avaliar se o aumento da *O*-GlcNAc altera a vasoconstrição via ativação da ERK 1/2;
2. Avaliar se a ausência endógena de IL-10 promove aumento da contração vascular, via ERK 1/2;
3. Avaliar se a ausência endógena de IL-10, assim como o aumento da *O*-GlcNAc, promove o aumento da atividade da ERK 1/2, através da fosforilação;
4. Avaliar se o aumento da *O*-GlcNAc interfere na expressão proteica da via de sinalização da IL-10;
5. Verificar o efeito do aumento tecidual da *O*-GlcNAc na produção de IL-10.

3. METODOLOGIA

Os procedimentos foram realizados no Laboratório de Biologia Vascular e no Laboratório de Biomodulação e Saúde Materno-Infantil da Universidade Federal de Mato Grosso, Campus do Araguaia, Barra do Garças; e no Laboratório de Farmacologia Cardiovascular e Trato Urinário do Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto

3.1. Animais:

Foram utilizadas duas linhagens de camundongos: camundongos C57BL/6, machos, com 12 semanas e camundongos *knockout* para IL-10 (B6.129P2-II10tm1Cgn/J) e seu controle, machos, também com 12 semanas. Os animais provenientes do Biotério do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, foram mantidos em caixas de polipropileno (quatro por caixa). As caixas foram acondicionadas em ambiente com temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e ciclos claro-escuro de 12 horas, com livre acesso a água e alimento. Foram utilizados um total de 50 camundongos. Todos os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UFMT número 23108.166477/2016-20.

3.2. Demonstração dos procedimentos experimentais:

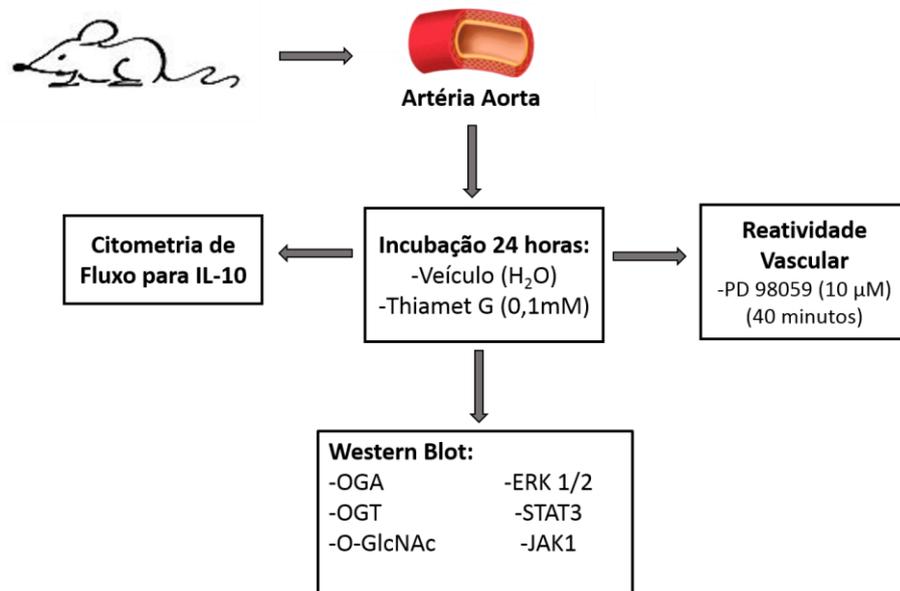


Figura 6. Desenho Experimental I. Após a retirada das artérias aorta, os vasos dos camundongos C57BL/6 foram incubados por 24 horas com Thiamet G, inibidor de OGA, para aumentar os níveis de O-GlcNAc. Após esse período, realizou-se a análise de reatividade vascular a fim de verificar sua resposta contrátil com e sem inibidor da ERK 1/2, PD 98059. Posteriormente, as expressões de algumas proteínas envolvidas foram determinadas, finalizando com a quantificação da IL-10 pelo método de citometria de fluxo.

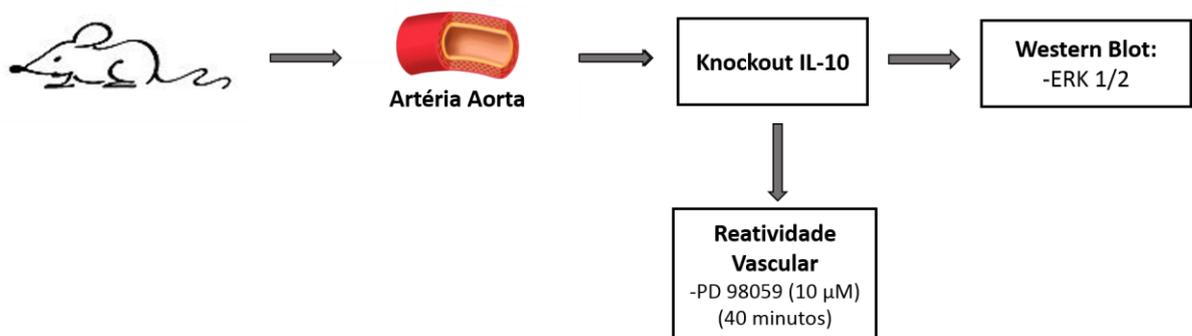


Figura 7. Desenho Experimental II. Artérias aorta de camundongos *knockout* para IL-10 foram submetidas a análise de reatividade vascular frente à estímulos contráteis com e sem inibidor da ERK 1/2, PD 98059. Além disso, verificou-se a expressão da ERK 1/2 por western blot.

3.3. Remoção da artéria aorta:

Os animais foram mortos em câmara de CO₂ e submetidos a laparotomia para remoção das artérias aortas, sendo armazenadas em solução de Krebs (contendo os seguintes sais e suas respectivas concentrações em mM: NaCl, 130; NaHCO₃, 14,9; KCl, 4,7; KH₂PO₄, 1,18; CaCl₂ · 2 H₂O, 1,56; EDTA, 0,026; Glicose 5,5) e mantidas em isopor com gelo até a utilização. As artérias foram limpas para retirada do tecido conectivo e gordura.

3.4. Procedimento *in vitro*:

Os animais tiveram seus segmentos de aorta colocados em poços de placas de cultura contendo 5 mL de meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina e estreptomicina; sendo acondicionados em estufa umidificada, com temperatura a 37 °C, gaseificadas com 95% de O₂ e 5% de CO₂. Em alguns segmentos da aorta foi realizada a incubação com veículo (H₂O) e em outros segmentos foi feita a incubação com Thiamet G (concentração final 10⁻⁴ mM, cat. #13237, Cayman), um inibidor da enzima OGA por 24 horas, a fim de aumentar os níveis globais de O-GlcNAc. Todos os segmentos de aorta foram incubados, com exceção do grupo dos camundongos *knockout* para IL-10 e seu controle.

3.5. Reatividade vascular:

Os poços do miógrafo foram preenchidos com 5 mL de solução de Krebs, a 37°C, continuamente gaseificada com uma mistura de gases contendo CO₂ (5%) e O₂ (95%). Os segmentos vasculares foram montados como preparações em anéis e acoplados a um miógrafo (Mulvany-Halpern, modelo 610M, Danish MyoTech) para medidas de tensão isométrica. Medidas de contração vascular foram realizadas utilizando um sistema de aquisição de dados (PowerLab 8/SP - ADInstruments Pty Ltd., Colorado Springs). Após acondicionadas nos miógrafos, a tensão basal das aortas foi ajustada e após, seguiu-se um período de estabilização por 60 minutos (sempre ajustando a tensão basal) em solução de Krebs a 37°C. A integridade do

vaso após estabilização foi verificada através do estímulo contrátil produzido por uma solução de cloreto de potássio (KCl, 120 mM). Após este teste, cada poço do miógrafo foi lavado com Krebs nas mesmas condições da estabilização por três vezes de 10 minutos cada, a fim de que a solução de KCl fosse totalmente retirada. O ajuste da tensão basal foi realizado apenas na última lavagem. A presença de endotélio foi avaliada em protocolo onde os segmentos de aortas foram contraídos com fenilefrina (1 μ M) e posteriormente estimulados com acetilcolina (1 μ M) para avaliar a porcentagem de relaxamento. Outra sequência de três lavagens foi realizada, ajustando a tensão basal na última lavagem. Em seguida, foi realizada curva concentração-resposta para fenilefrina (1nM a 100 μ M) e nova sequência de três lavagens. Posteriormente, adicionou-se o PD 98059 (10 μ M), inibidor da ERK 1/2, por 40 minutos. Por fim, a curva concentração-resposta para fenilefrina foi novamente realizada. Os dados da curva foram analisados no programa Prisma (GraphPad Prism 5.0, Graph Pad Software Incorporated, CA). A potência dos agonistas e a resposta máxima foram expressas como pD_2 (logarítmo negativo da concentração molar que produz 50% da resposta máxima) e E_{max} (máximo efeito produzido pelo agonista), respectivamente.

3.6. Extração de proteínas:

Após a remoção e/ou incubação, as aortas foram acondicionadas individualmente em tubos criogênicos e colocadas no nitrogênio líquido para uso imediato. As aortas foram pulverizadas mecanicamente e transferidas para tubos plásticos cônicos, com capacidade de 1,5 mL. Durante o processo, as aortas já pulverizadas foram mantidas no gelo e posteriormente acrescentou-se cerca de 60 a 70 μ L de tampão Ripa (cat. #R0278; Sigma, St. Louis, MO) acrescido de 10% de inibidor de proteases (cat. #S8820; Sigma, St. Louis, MO) em cada amostra. Os tubos plásticos cônicos foram homogeneizados em vórtex, a cada 10 minutos, por um período total de 1 hora. Após esse período, o conteúdo foi centrifugado à 4°C, com 6000 rpm, por 6 minutos. Por fim, o sobrenadante foi transferido para tubos plásticos cônicos identificados e armazenados no gelo para posterior quantificação.

3.7. Quantificação de proteínas por ensaio de bradford:

Uma fração do sobrenadante de cada amostra extraída anteriormente foi utilizada para preparar-se uma diluição de 1:10 (3 μ L de amostra e 27 μ L de tampão Ripa). Utilizou-se uma placa com 96 poços de fundo reto. A pipetagem foi feita em duplicatas adicionando-se individualmente 10 μ L da curva padrão (BSA 2 mg/mL a 0,03125 mg/mL), 10 μ L do tampão Ripa (branco) ou 10 μ L de cada amostra. Então, pipetou-se 250 μ L do reagente Bradford em todos os poços citados anteriormente. A placa foi levada ao leitor de placas (Thermoplate, TP reader) e a leitura foi realizada em comprimento de onda de 595 nm. As concentrações das proteínas totais foram calculadas baseadas na curva padrão de BSA, após realização da equação da reta.

3.8. Western blot:

Com as proteínas já quantificadas e padronizadas para um total de 40 μ g, preparou-se as amostras adicionando o tampão Ripa e tampão de amostra com suas quantidades previamente calculadas a partir do valor da quantificação de cada amostra, obtendo-se um volume final de 50 μ L. As amostras foram preparadas em tubos plásticos cônicos de 1,5 mL e aquecidas, a 99°C, por 10 minutos. Após esse tempo, as amostras foram resfriadas imediatamente em gelo. A placa com o gel SDS-PAGE de corrida (10%) e gel de concentração de amostra foi montada na cuba com tampão de corrida (200 mL de tampão de eletroforese 10x, 1800 mL de H₂O Ultrapura). Foram pipetados 13 μ L de amostra em cada poço, assim como o padrão de peso molecular (PageRuler™, Prestained Protein Ladder). A corrida ocorreu à 4°C, com 100 Volts, por 2 horas. Após esse período, o gel foi retirado e iniciou-se a montagem do “sanduíche” (esponja, papel de filtro, gel, membrana, papel de filtro e esponja) para posterior transferência das proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose. Foram colocados novamente na cuba de eletroforese, agora preenchida com tampão de transferência (100 mL de tampão de transferência 10X, 200 mL de metanol, 700 mL de H₂O Ultrapura) e suporte de gelo. A transferência ocorreu à 4°C, 100 Volts por 2 horas. A correta transferência das amostras para a membrana de nitrocelulose foi verificada através da solução de Ponceau, que revela através de coloração as bandas das proteínas transferidas do gel para a membrana. A membrana fica imersa em solução de Ponceau até que as bandas possam ser detectadas (1 minuto). Feito isso, a membrana é lavada com TBS-T até todo o excesso de Ponceau ser retirado.

As membranas foram bloqueadas com 5 mL de TBS-T/BSA 5% por uma hora, em

temperatura ambiente, para prosseguir com a incubação com os anticorpos primários (**Tabela 1**). A incubação com anticorpo primário ocorreu por 12 horas, a 4°C, sob constante agitação. Passado o tempo, os anticorpos foram retirados e as membranas lavadas com TBS-T por três vezes, 10 minutos cada. Em seguida foram incubadas com os anticorpos secundários (**Tabela 1**) por 1 hora, à temperatura ambiente e constante agitação. Após isso, os anticorpos secundários foram retirados e as membranas foram lavadas com TBS-T por três vezes de 10 minutos. Por fim, a membrana foi revelada no equipamento de ImageQuant LAS 4000, que detecta a quimioluminescência por meio do reagente de quimioluminescência (Pierce ECL Western Blotting Substrate, Thermo Fischer, cat. #32209).

Após a análise dos primeiros anticorpos, as membranas foram incubadas com tampão deblote (12,5 mL Tris HCl 0,5 M, 20 mL SDS 10%, 0,8 mL β -mercaptoetanol, 67,5 mL H₂O Ultrapura) por 5 minutos, à temperatura ambiente, para a avaliação de novas proteínas. Passado este tempo, as membranas foram lavadas por três vezes, de 10 minutos cada, com TBS-T e bloqueadas por uma hora com TBS-T/BSA 5%. Neste momento, as membranas estavam aptas para serem utilizadas novamente. A expressão proteica foi normalizada pela expressão de β -actina ou pela forma não fosforilada da proteína, conforme indicado nas legendas. A intensidade luminosa das bandas foi avaliada utilizando o software ImageJ 1.49v. Esse procedimento foi utilizado para verificar a expressão de O-GlcNAc, OGA, OGT, STAT3, JAK1 e ERK 1/2.

Tabela 1. Relação dos anticorpos primários e secundários e suas diluições.

Anticorpo Primário (Diluição)	Anticorpo Secundário (Diluição)	Peso Molecular	Empresa
O-GlcNAc (1:500)	Camundongo (1:5000)	Vários	Cat. # 07764. Sigma, St. Lois, MO, USA.
OGT (1:1000)	Coelho (1:500)	110-117 kDa	Cat. #Ab50273. Abcam, Cambridge, MA, USA.
OGA (1:500)	Coelho (1:250)	130 kDa	Cat. #4200311. Sigma, St. Lois, MO, USA.
ERK 1/2 (1:1000)	Coelho (1:500)	42-44 kDa	Cat. #4695. Cell Signaling Technology, Inc. Danvers, MA, EUA.

ERK 1/2 phospho p44/42 (1:1000)	Coelho (1:2500)	42-44 kDa	Cat. #9102. Cell Signaling Technology, Inc. Danvers, MA, EUA.
STAT3 (1:400)	Ovelha (1:2000)	92 kDa	Cat. #17991. R&D Systems a biotechne brand, Minneapolis, USA.
STAT3 phospho Y705 (1:250)	Rato (1:1000)	95 kDa	Cat. #mab4607. R&D Systems a biotechne brand, Minneapolis, USA.
JAK1 (1:500)	Rato (1:1000)	130 kDa	Cat. #mab4260. R&D Systems a biotechne brand, Minneapolis, USA.
β -actina (1:2000)	Coelho (1:5000)	45 kDa	Cat. #4967. Cell Signaling Technology, Inc. Danvers, MA, EUA.

3.9. Teste de Citometria de Fluxo:

As amostras selecionadas de aortas foram padronizadas para 40 μ g. Utilizou-se o aparelho Citômetro (FACS Calibur, BD Bioscience, USA) para a dosagem de interleucina-10 com a utilização do Kit “Mouse IL-10 Flex Set” (CBA, BD Bioscience, USA; cat 558300), seguindo as orientações técnicas contidas nos protocolos preconizados pelo fabricante. Esta técnica consiste num método de captura de um analito solúvel específico ou de um conjunto de analitos com esferas de tamanho e fluorescência conhecidos, fazendo com que seja possível detectar os analitos usando a citometria de fluxo.

Primeiramente, preparou-se as diluições dos padrões que variou de 2,500 pg/mL a 0 pg/mL (controle negativo). Após isso, pipetou-se 50 μ L de cada padrão (iniciando da menor para a maior concentração) e das amostras em seus respectivos tubos. Posteriormente, adicionou-se 50 μ L de “Beads de Captura” em todos os tubos, homogeneizando gentilmente, e incubou-se por 1 hora, à temperatura ambiente, protegido da luz. Passado este tempo, pipetou-se 50 μ L do “Reagente de Detecção” em todos os tubos, incubando novamente por 1 hora, à temperatura

ambiente, protegido da luz. Adicionou-se 1 mL de “Wash Buffer” em todos os tubos e centrifugou-se por 5 minutos a 200g (1875 rpm). Cerca de 500 μ L do sobrenadante foi aspirado cuidadosamente e descartado. Por fim, adicionou-se 300 μ L de “Wash Buffer” em todos os tubos, homogeneizou-os no vórtex para fazer a leitura no citômetro.

Os dados obtidos no citômetro foram analisados com auxílio do software específico para CBA (FCAP Array TM Software, BD, Pharmingen, EUA), por meio de curvas de calibração obtidas dos padrões da citocina do kit. Após a construção das curvas, a concentração dos analitos na amostra foi determinada em pg/mL, a partir dos valores de Intensidade Média de Fluorescência (MFI).

3.10. Análise estatística:

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). As curvas concentração-resposta para os agonistas foram submetidas à análise de regressão não-linear usando o programa Prisma (GraphPad Prism 5.0, Graph Pad Software Incorporated, CA). A significância estatística dos dados foi determinada por meio do teste “t” e normalizados pelos valores de contração de KCl (120 mmol/L), que foi considerada igual a 100%. Os resultados do western blot foram normalizados pela expressão de β -actina ou pela forma não fosforilada da proteína e analisados pelo teste “t” de uma amostra e o valor de P foi calculado pela razão “t” e pelos graus de liberdade com valor 1. Valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4. RESULTADOS

4.1. Aumento dos níveis de O-GlcNAc por Thiamet G e a expressão de OGT e OGA:

O aumento dos níveis globais de O-GlcNAc foi induzido através do uso de Thiamet G (inibidor altamente seletivo de OGA) e pode ser constatado por meio da técnica de western blot (**Figura 8**). Após 24 horas de incubação, a expressão proteica da enzima OGT não sofreu alteração, enquanto a enzima OGA teve aumento significativo (**Figura 9**).

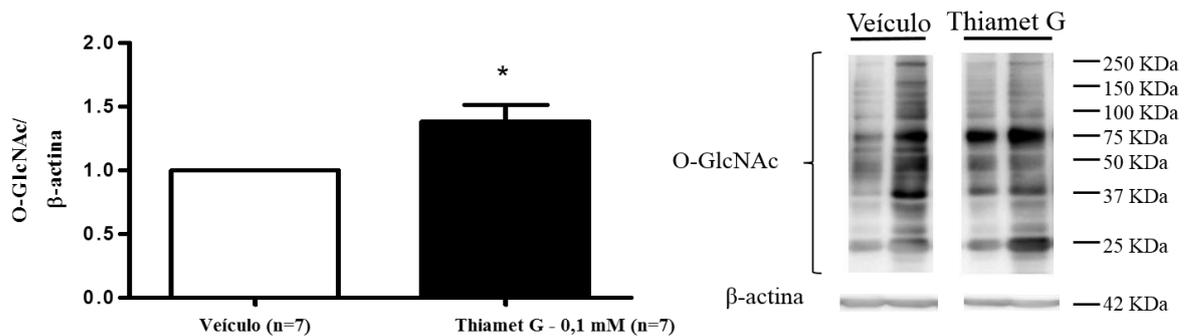


Figura 8. Incubação com Thiamet G por 24 horas aumentou a expressão de O-GlcNAc em artéria aorta de camundongos C57BL/6. O gráfico demonstra a análise da expressão de O-GlcNAc por western blot após 24 horas de incubação com Thiamet G (0,1mM), acompanhado da imagem representativa. Os valores foram normalizados pela expressão de β-actina. Os resultados são apresentados como média ± EPM de cada grupo experimental. A comparação estatística foi feita por Teste *t* Student com graus de liberdade com valor = 1. *P < 0,05 vs. Veículo (H₂O).

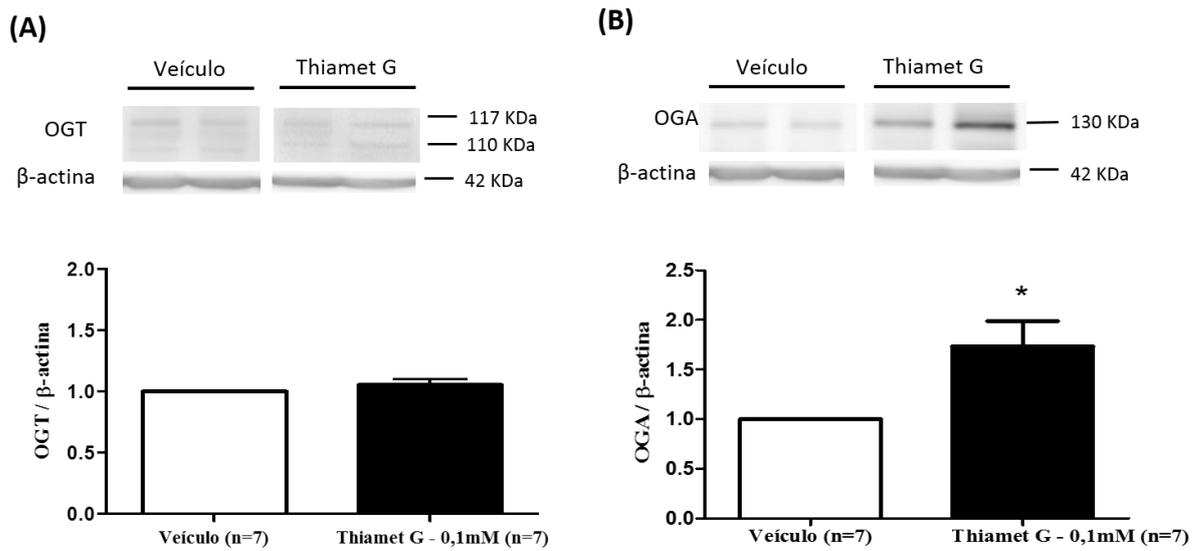


Figura 9. A expressão de OGT após incubação com Thiamet G em camundongos C57BL/6 por 24 horas, permaneceu inalterada, enquanto houve aumento na expressão de OGA. O gráfico demonstra a análise da expressão de (A) OGT e (B) OGA por western blot após 24 horas de incubação com Thiamet G (0,1mM), acompanhado da imagem representativa. Os valores foram normalizados pela expressão de β -actina. Os resultados são apresentados como média \pm EPM de cada grupo experimental. A comparação estatística foi feita por Teste t Student com graus de liberdade com valor = 1. *P < 0,05 vs. veículo (H₂O).

4.2. Aumento de O-GlcNAc promovendo vasoconstrição via ERK 1/2

As análises de reatividade vascular mostram que o grupo de vasos incubados com Thiamet G apresentou aumento na contração vascular quando comparados aos vasos incubados com veículo (**Figura 10A**). Após incubação por 40 minutos com o inibidor da ERK 1/2, PD 98059, a resposta contrátil foi normalizada (**Figura 10B**). A resposta máxima e a potência dos agonista estão expressas na **tabela 2**.

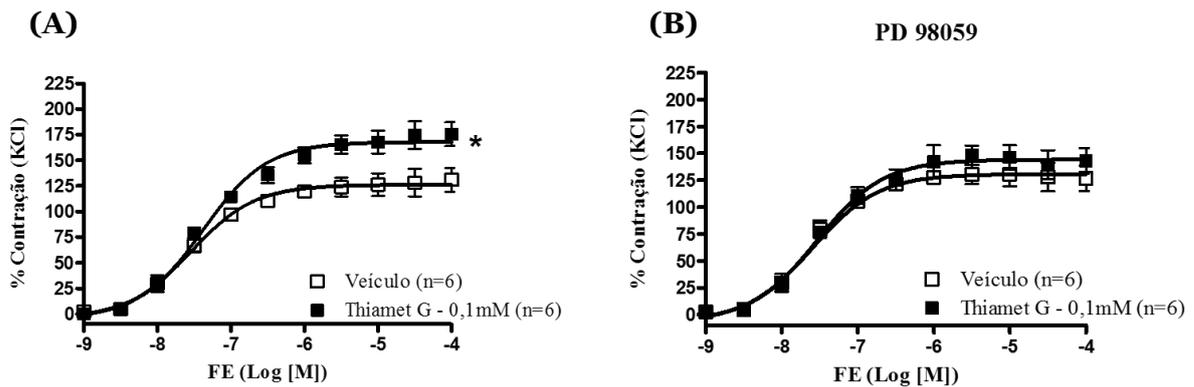


Figura 10. O aumento da contração vascular de camundongos C57BL/6 tratados com Thiamet G diminui frente ao PD 98059, inibidor da ERK 1/2. A incubação com Thiamet G (0,1mM) aumentou a contração vascular quando comparado ao veículo (H₂O) (A). O uso do inibidor PD 98059 (10 µM) normalizou a resposta contrátil, quando comparados com os valores dos vasos incubados com veículo (B). Os valores de contração foram calculados em relação a contração máxima por KCl (120 mmol/L) considerada como 100%. Os resultados são apresentados como média ± EPM de cada grupo experimental. A significância estatística dos dados foi determinada por meio do teste *t*. *P < 0,05 vs. veículo.

Tabela 2. Valores de E_{máx} e pD₂ para contração de aortas torácicas de camundongos C57BL/6 induzidas por fenilefrina, após 24 horas de incubação com Thiamet G na presença ou ausência do inibidor da ERK 1/2, PD 98059.

	Fenilefrina		Fenilefrina + PD 98059	
	E _{máx}	pD ₂	E _{máx}	pD ₂
Veículo	126,1±3,23	7,54±0,09	130,7±3,56	7,59±0,07
Thiamet G	167,9±3,46*	7,37±0,07	144,2±1,89	7,53±0,04

Os resultados foram expressos por média ± erro padrão médio de cada grupo experimental (n=6). A significância estatística dos dados foi determinada por meio do teste *t* Student. * P < 0,05 vs. Veículo (H₂O)

O aumento da expressão/atividade de ERK 1/2 em resposta à presença de O-GlcNAc foi comprovado por meio da razão da expressão protéica na forma fosforilada pela forma total, como demonstrado na **figura 11**.

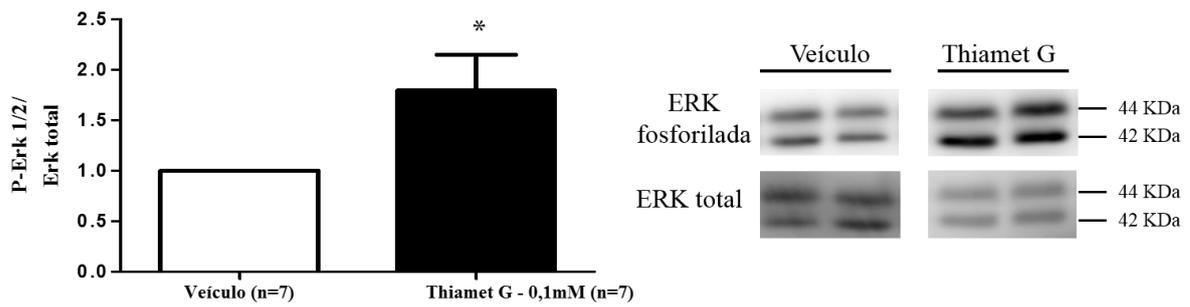


Figura 11. A expressão/atividade de ERK 1/2 se elevam frente o aumento de O-GlcNAc. O gráfico demonstra que após 24 horas de incubação com Thiamet G (0,1 mM) houve aumento da atividade de ERK 1/2 comparado ao seu veículo (H₂O). Os valores foram normalizados pela expressão de ERK total. Os resultados são apresentados como média ± EPM de cada grupo experimental. A comparação estatística foi feita por Teste *t* Student com graus de liberdade com valor= 1. *P < 0,05 vs. veículo.

4.3. Papel endógeno da IL-10 nos efeitos vasculares mediados por ERK 1/2

A contração vascular de segmentos da aorta de camundongos *knockout* para IL-10 foi maior quando comparada ao seu controle (**Figura 12A**). Em presença de PD 98059, inibidor da ERK 1/2, a resposta contrátil do grupo *knockout* para IL-10 foi normalizada à níveis do controle (**Figura 12B**). A resposta máxima e a potência dos agonista estão expressas na **tabela 3**.

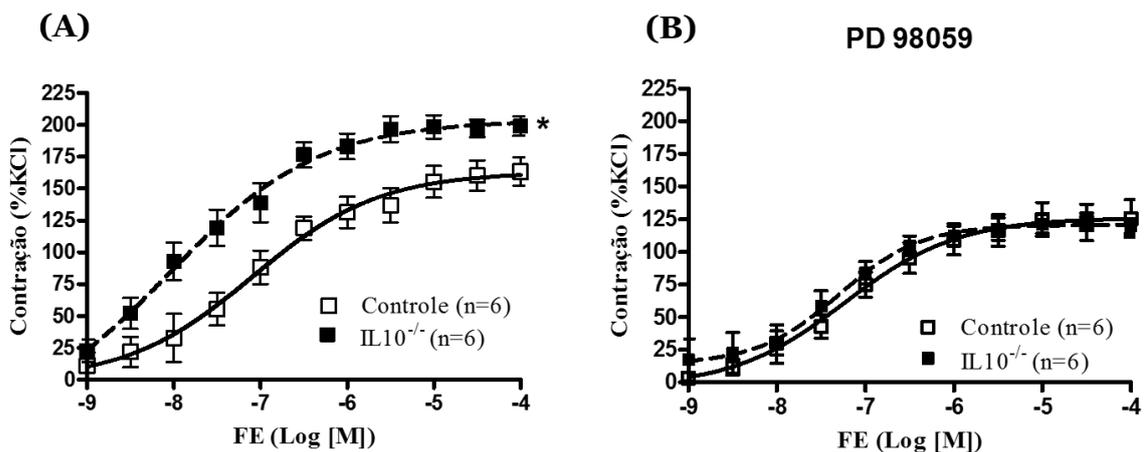


Figura 12. O aumento da contração vascular de camundongos *knockout* para IL-10 é prevenida pelo PD 98059, inibidor da ERK 1/2. Camundongos *knockout* para IL-10 apresentaram maior contração quando comparado ao controle (A). O uso do inibidor PD 98059 (10 μM) normalizou a resposta contrátil, quando comparados com os valores de contração do grupo controle (B). Os valores de contração foram calculados em relação a contração máxima por KCl (120 mmol/L) considerada como 100%. Os resultados são apresentados como média ± EPM de cada grupo experimental. A significância estatística dos dados foi determinada por meio do teste *t*. *P < 0,05 vs. controle.

Tabela 3. Valores de $E_{m\acute{a}x}$ e pD_2 para contração de aortas torácicas induzidas por fenilefrina em camundongos *knockout* para IL-10, na presença e ausência do inibidor da ERK 1/2, PD 98059.

	Fenilefrina		Fenilefrina + PD 98059	
	$E_{m\acute{a}x}$	pD_2	$E_{m\acute{a}x}$	pD_2
Controle	163,0 ± 10,64	7,08 ± 0,24	126,0 ± 7,35	7,22 ± 0,23
IL-10^{-/-}	203,6 ± 8,39*	8,04 ± 0,49	120,7 ± 5,40	7,29 ± 0,17

Os resultados foram expressos por média ± erro padrão médio de cada grupo experimental (n=6). A significância estatística dos dados foi determinada por meio do teste t Student. * P < 0,05 vs. controle

O aumento da expressão/atividade de ERK 1/2 em camundongos *knockout* para IL-10 foi comprovado por meio da análise de suas expressões pela técnica de western blot (**Figura 13**).

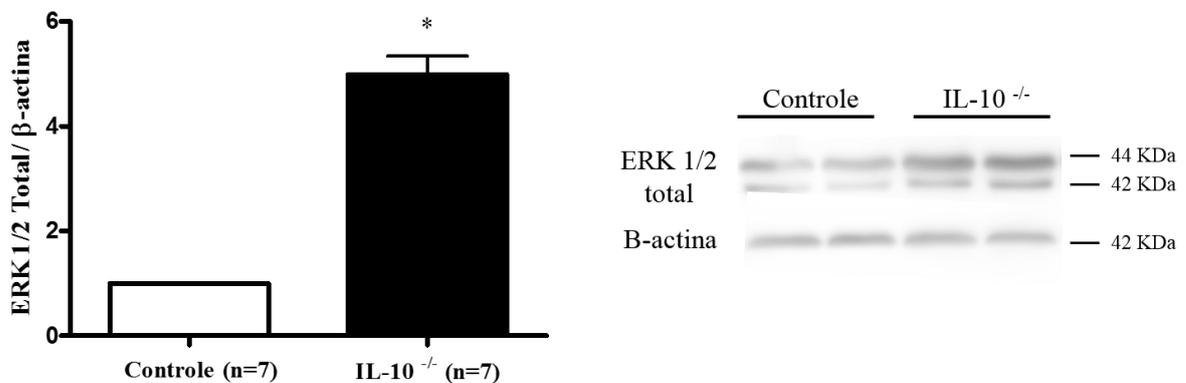


Figura 13. A expressão/atividade de ERK 1/2 se elevam na ausência de interleucina-10. O gráfico demonstra que camundongos *knockout* para IL-10 apresenta maior expressão de ERK 1/2 comparado ao seu controle. Os valores foram normalizados pela expressão de β -actina. Os resultados são apresentados como média ± EPM de cada grupo experimental. A comparação estatística foi feita por Teste t Student com graus de liberdade com valor = 1. *P < 0,05 vs. controle.

4.4. O-GlcNAc na modulação da via de sinalização de IL-10

A atividade do fator de transcrição STAT3 mostra-se diminuída frente o aumento de O-GlcNAc. Por outro lado, a expressão da JAK1 encontra-se aumentada nas mesmas condições (**Figura 14**).

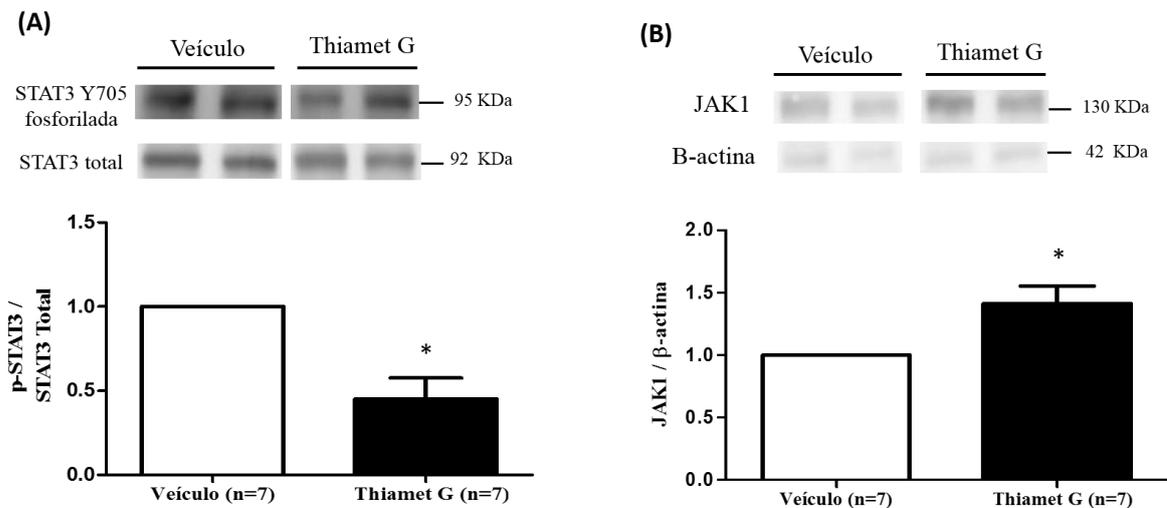


Figura 14. A atividade de STAT3 diminui frente ao aumento de O-GlcNAc, enquanto a expressão de JAK1 encontra-se aumentada. O gráfico demonstra que após 24 horas de incubação com Thiamet G (0,1 mM) houve diminuição da atividade de STAT3 comparado ao seu veículo (H₂O). Já a análise de JAK1 mostrou expressão aumentada quando comparada ao seu veículo. Os valores foram normalizados pela expressão de STAT3 total ou β -actina. Os resultados são apresentados como média \pm EPM de cada grupo experimental. A comparação estatística foi feita por Teste t Student com graus de liberdade com valor= 1. *P < 0,05 vs. veículo.

4.5. Efeito do aumento tecidual de O-GlcNAc nos níveis de IL-10

Por fim, avaliamos os níveis de IL-10 em vasos tratados com Thiamet G, por 24 horas. Foi observado que o aumento dos níveis de O-GlcNAc é capaz de diminuir os níveis teciduais de IL-10 em artéria aorta (**Figura 15**).

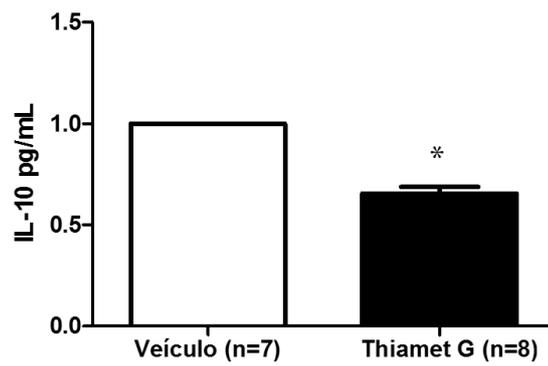


Figura 15. Os níveis teciduais de IL-10 foram diminuídos após o aumento de O-GlcNAc. O gráfico demonstra que após 24 horas de incubação com Thiamet G (0,1 mM) houve diminuição de IL-10 na artéria aorta quando comparado ao seu veículo (H₂O). Os resultados são apresentados como média ± EPM de cada grupo experimental. A comparação estatística foi feita por Teste t Student com graus de liberdade com valor= 1. *P < 0,05 vs. veículo

5. DISCUSSÃO

Apesar de proteínas com importante papel na função vascular serem alvo da O-GlcNAc (LIMA et al., 2012) e o promissor papel da IL-10 na vasculatura ter sido relatado por vários estudos (GIACHINI et al., 2009; KASSAN et al., 2011; THUSEN et al., 2003; GUNNETT et al., 1999), a associação destes dois fatores ainda é uma área inexplorada.

Demonstramos neste estudo que após 24 horas de incubação com Thiamet G, os níveis totais de O-GlcNAc foram aumentados, confirmando a eficácia esperada deste inibidor como já relatado em outros estudos (LIM et al., 2015; ALONSO; SCHIMPL; AALTEN, 2014; ZHANG et al., 2014; YU et al., 2012). Além deste, outros inibidores de OGA estão disponíveis comercialmente, tais como: PUGNAc e a estreptozotocina (LIMA et al., 2009). Entretanto, o Thiamet G faz parte da família das NAG-tiazolinas e se destaca por ser o inibidor disponível mais seletivo (ALONSO; SCHIMPL; AALTEN, 2014).

Ao analisar as enzimas envolvidas no processo de O-Glicosilação, pode-se observar que frente o tratamento com Thiamet G os níveis de OGT permaneceram inalterados, enquanto a expressão de OGA aumentou significativamente, corroborando com os resultados de Zhang *et al* (2014) que estudou os efeitos deste inibidor em várias linhagens de células. Especula-se que apesar de ocorrer inicialmente uma inibição farmacológica de OGA com resultante aumento de O-GlcNAc, passado 24 horas de incubação, a expressão de OGA se elevará em busca de homeostasia. Tal fato ocorre já que a enzima OGA é sensível às mudanças dos níveis de O-GlcNAc, enquanto OGT é controlada pelos níveis de UDP-GlcNAc (produto final da via da biossíntese da hexosamina) do citosol e do núcleo (KREPPEL; HART, 1999; ZACHARA et al., 2004; ZHANG et al., 2014).

O aumento de O-GlcNAc promove um desequilíbrio nos mecanismos de sinalização celular responsáveis pela contração e relaxamento das CMLV, tornando a vasculatura mais sensível à estímulos vasculares (LIMA et al., 2009). Neste estudo, pôde-se observar um aumento da resposta contrátil aos estímulos vasoconstritores, concomitantemente ao aumento dos níveis de O-GlcNAc. Essa MPT é capaz de aumentar a resposta contrátil dos vasos frente a diversos agonistas como a fenilefrina, endotelina-1 e angiotensina II (LIMA et al., 2011).

Os resultados deste estudo também demonstraram que o aumento da contração da artéria aorta de camundongos tratados com Thiamet G diminui frente ao PD 98059, inibidor

da ERK 1/2. Além disso, a maior atividade desta cinase nestas condições foi observada pela análise de western blot. Tais comprovações fortalecem a hipótese de que níveis elevados de O-GlcNAc resultam em um aumento da fosforilação/ativação da ERK 1/2, favorecendo a disfunção vascular.

O funcionamento dinâmico modula o comportamento das proteínas O-glicosiladas, resultante muitas vezes da interação entre O-GlcNAc e fosforilação. Uma mesma proteína pode sofrer os dois tipos de modificações pós-traducionais. Tal interação é complexa, os locais de O-Glicosilação podem ser compartilhados ou localizados perto dos mesmos resíduos onde ocorre a fosforilação (HU; SHIMOJI; HART, 2010; ZEIDAN; HART, 2010).

Níveis globais elevados de O-GlcNAc após incubação com um inibidor de OGA foram capazes de promover uma ocupação de cerca de 700 locais de fosforilação em células NHI3T3 (linhagem celular de fibroblasto) não estimuladas (HART et al., 2011; HU; SHIMOJI; HART, 2010). No mesmo sentido, quando há um decréscimo da expressão de OGT, vias reguladas por fosforilação foram drasticamente reduzidas. A O-GlcNAc elevada é capaz de reduzir significativamente a fosforilação de cerca de 280 locais e aumentar a fosforilação em 149 locais (HU; SHIMOJI; HART, 2010), demonstrando que ela pode tanto estimular quanto inibir importantes cascatas de sinalização (LIMA et al., 2012; HART et al., 2011; WANG; GUCEK; HART, 2008).

Uma das proteínas que sofre alteração da sua atividade após ação de O-GlcNAc é a ERK 1/2 por meio da regulação positiva da fosforilação, como mostrado no estudo de Tallent *et al.* (2009) em sinapses neuronais do hipocampo. A elevação farmacológica de O-GlcNAc *in vivo*, aumenta concomitantemente a fosforilação da serina 62/67 (sítio de ERK 1/2). A ativação desta cinase tem sido relacionadas com a regulação da permeabilidade do endotélio vascular, com a produção de citocinas e com o tônus vasomotor, implicando em problemas como edema e disfunção de órgãos (MUSLIN, 2008).

Diversas respostas contráteis envolvem mecanismos dependentes de ERK 1/2, como por exemplo a contração do músculo liso coronário por endotelina-1 e a contração de vasos mesentéricos e renais por noradrenalina. O envolvimento de ERK 1/2 é constatado quando utiliza-se seu inibidor, PD 98059, resultando em uma menor contração (KHAN et al., 2004). PD 98059 é um inibidor seletivo da ativação de ERK 1/2, atuando como um inibidor alostérico que age se ligando no sítio de ATP e ERK 1/2 na MEK 1/2. Ao modificar a

estrutura tridimensional de MEK 1/2, a fosforilação por cinases não ocorre, impedindo assim a ativação da ERK 1/2 (KOHNO; POUYSSEGUR, 2003).

Em CMLV de aorta de ratos em presença dos agentes vasoativos, tais como Ang II e ET-1, houve ativação da via das MAPK e consequente proliferação celular (DUFF; BERK; CORSON, 1992; MOLLOY; TAYLOR; WEBER, 1993; SCHMITZ et al., 1998). A contração da aorta por serotonina também mostrou ser via ativação das MAPK, já que seu efeito foi atenuado em presença de um inibidor de MEK 1/2 (ISHIHATA; TASAKI; KATANO, 2002).

Evidências científicas vem demonstrando que as moléculas inflamatórias estão envolvidas em parte na patogênese das doenças cardiovasculares, obesidade, DM2 e aterosclerose. A base molecular complexa que envolvem as doenças cardiovasculares inclui várias vias biológicas como o metabolismo dos lipídeos e glicose, a reparação vascular e a angiogênese, interessante, todas estas envolvendo vias inflamatórias (XUAN et al., 2016; KAESS et al., 2015).

Devido a sua função anti-inflamatória, estudos sobre a citocina interleucina-10 vem ganhando destaque. Dados epidemiológicos reconhecem uma associação entre os níveis baixos de IL-10 plasmática com o risco aumentado de doenças cardiovasculares como as doenças trombóticas arteriais, a síndrome coronariana aguda e a isquemia cerebral (HEESCHEN et al., 2003). Exel *et al.* (2002), relataram uma associação entre uma baixa capacidade de produção de IL-10 com a síndrome metabólica e DM2. Eles mostraram que o tratamento com citocinas pró-inflamatórias induz hipertrigliceridemia e resistência à insulina. Níveis elevados de IL-10 teoricamente devem provocar uma regulação positiva da atividade de tirosina cinase do receptor de insulina e diminuir a lipólise, graças ao seu efeito de regulação de TNF- α e IL-6. A IL-6 se encontra em níveis aumentados em indivíduos diabéticos ou com síndrome metabólica, enquanto TNF- α regula negativamente a atividade da cinase de tirosina do receptor de insulina, o que aumenta a resistência insulínica. O uso da IL-10 como ferramenta terapêutica parece ser algo promissor, no entanto, são necessários mais estudos para confirmar esta associação (RUIZ-CANELA; BES-RASTROLLO; MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, 2016; EXEL et al., 2002).

Ao analisar-se a reatividade vascular de camundongos *knockout* para IL-10 nota-se um aumento da contração na ausência endógena de IL-10, sugerindo sua atividade benéfica nas funções vasculares. Considerando que vários estudos mostram que tal efeito protetor de IL-10 nas alterações de reatividade vascular ocorre por meio de efeitos inibitórios sobre a atividade

de ERK 1/2 (CHEN et al., 2005; GUNNETT et al., 2000; VILA; SALAICES, 2005), resolvemos verificar o papel da ERK1/2 nos vasos de camundongos *knockout* para IL-10. Como sugerido em nossa hipótese, o uso do inibidor da ERK 1/2, possibilitou a normalização da contração nestes animais *knockout* para IL-10. Giachini *et al.* (2009) também demonstraram que a IL-10 tem efeito protetor vascular em condições em que a ativação de ERK 1/2 se encontra elevada. A fim de reforçar esta hipótese, verificamos através da técnica de western blot que a supressão de IL-10 é capaz de aumentar a atividade da ERK 1/2, em aorta torácica de camundongos.

A IL-10 é capaz de regular positivamente a atividade de uma fosfatase importante na modulação da via da ERK 1/2, a fosfatase de proteína cinase ativada por mitógeno-1 (MKP-1) (ABRAHAM; CLARK, 2006; HAMMER et al., 2005). Essa fosfatase é responsável por inativar MAPK por desfosforilação de ambos os resíduos de fosfoserina/fosfotreonina e fosfotirosina do substrato. A MKP-1 proporciona um mecanismo de feedback negativo importante que limita as cascatas de MAPK (LI et al., 2015).

A ativação de MKP-1 desempenha papel importante na inativação da atividade da via da ERK 1/2. Quando MKP-1 é fosforilada a sua degradação é inibida, conseqüentemente, sua atividade inibitória é aumentada (BRONDELLO; POUYSSÉGUR; MCKENZIE, 1999; FULLER et al., 1997). Portanto, este seria um interessante alvo a ser avaliado no futuro, visto que, em condições inflamatórias, IL-10 prolonga a expressão de MKP-1 (HAMMER et al., 2005). Além disso, a supressão de MKP-1 resulta em um aumento na produção de IL-10, sendo uma provável tentativa para regular positivamente a fosfatase (CHI et al., 2006; ZHAO et al., 2006). Tem sido sugerido que MKP-1 medeia os efeitos anti-inflamatórios de IL-10 (WANCKET; FRAZIER; LIU, 2012; HAMMER et al., 2005). Por outro lado, as citocinas pró-inflamatórias interferon-gama (IFN- γ) e fator de inibição de macrófagos (MIF) inibem a expressão de MKP-1 (WANCKET; FRAZIER; LIU, 2012).

Ao analisar-se a via de sinalização da IL-10 frente ao aumento de O-GlcNAc, nota-se que seu fator de transcrição, STAT3, apresentou uma diminuição na sua atividade. Conseqüentemente, os níveis finais de IL-10 também diminuíram. Em contrapartida, a expressão de JAK1 obteve aumento, sugerindo uma tentativa de regulação aos níveis baixos de interleucina-10.

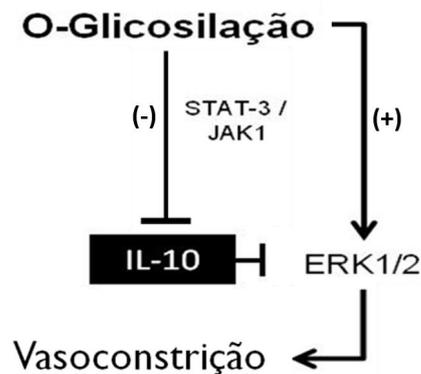
Níveis aumentados de sacarose, elevam a O-GlcNAc e resultam em resistência à leptina na ingestão de alimentos. O aumento de sacarídeo provoca alterações no metabolismo,

perturbando a sinalização de leptina. Os estudos *in vitro* mostram que o aumento da glicose e da leptina podem, cada um independentemente, aumentar a O-glicosilação das proteínas GFAT e pSTAT3 (Y705). Ao contrário do que ocorre normalmente, onde leptina é capaz de estimular a fosforilação de STAT3, em presença de glicose a fosforilação de STAT3 por leptina foi diminuída (ZIMMERMAN; HARRIS, 2015). Outros estudos relataram que STAT3 pode ser modificado por O-GlcNAc, diminuindo sua fosforilação e consequentemente diminuindo a sinalização de IL-10; porém, os locais específicos desta modificação não foram determinados (ZIMMERMAN; HARRIS, 2015; WHELAN; LANE; HART, 2008). Além disso, mutações de perda de função, como as encontradas nos receptores IL10R1 e IL10R2, identificadas na doença inflamatória intestinal foram associadas com resposta anti-inflamatória ineficaz de IL-10 (PUTOCZKI; ERNST, 2015; GLOCKER et al., 2009).

Frente ao exposto, verificamos que a O-GlcNAc e a ausência endógena de IL-10 promovem o aumento da contração vascular, pelo menos em parte, via modulação da fosforilação de ERK 1/2. Adicionalmente, verificamos que o aumento da O-GlcNAc altera a via de sinalização de IL-10, promovendo a redução da atividade da STAT3, diminuindo assim a concentração e as ações da IL-10 na vasculatura. Neste sentido, seria ideal encontrar meios de controlar o aumento de O-GlcNAc e/ou elevar os níveis de IL-10. Portanto, acreditamos que inibidores eficazes de OGT e/ou formas de se aumentar as fontes endógenas de IL-10 podem se tornar terapias promissoras para patologias onde é observado alterações nos níveis de O-Glicosilação e IL-10, tais como hipertensão e diabetes.

6. CONCLUSÕES

O papel de proteínas modificadas por O-glicosilação com N-acetil-glucosamina tem sido amplamente relacionada ao desenvolvimento e progressão de várias doenças crônicas. Os resultados apresentados comprovam que os níveis elevados de O-GlcNAc em artérias aorta aumentam a contração vascular, via hiperativação da ERK 1/2. Além disso, a ausência endógena de IL-10 também promoveu maior contratilidade vascular relacionada à maior expressão de ERK 1/2. Esta modificação pós-traducional foi capaz de interferir na via de sinalização da IL-10, reduzindo seu fator de transcrição STAT3, resultando em níveis menores de IL-10 tecidual; a qual possui funções de proteção vascular, sendo capaz além de controlar o processo inflamatório responsável por diversas patologias, regular a ativação da via da ERK 1/2. Portanto, nossos dados sugerem que O-GlcNAc tem propriedades que promovem a disfunção vascular de forma direta ou via comprometimento das ações da IL-10. Sendo assim, além dos cuidados com o estilo de vida, mais estudos podem possibilitar novas terapias medicamentosas a fim de controlar os efeitos de O-GlcNAc sobre importantes vias de sinalização envolvidas na resposta vascular.



7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, S. M.; CLARK, A. R. Dual-specificity phosphatase 1: a critical regulator of innate immune responses. **Biochem Soc Trans**, v. 34, n. 6, p. 1018–1023, dez. 2006.

AIHARA, M. et al. Comparison of effects of Y-27632 and Isoproterenol on release of cytokines from human peripheral T cells. **Int Immunopharmacol**, v. 3, n. 12, p. 1619–1625, nov. 2003.

ALAHYAN, M. et al. The mechanism of smooth muscle caldesmon-tropomyosin inhibition of the elementary steps of the actomyosin ATPase. **J Biol Chem**, v. 281, n. 28, p. 19433–19448, 14 jul. 2006.

ALONSO, J.; SCHIMPL, M.; AALTEN, D. M. F. V. O-GlcNAcase: Promiscuous hexosaminidase or key regulator of O-GlcNAc signaling? **J Biol Chem**, v. 289, n. 50, p. 34433–34439, 2014.

ASADULLAH, K.; STERRY, W.; VOLK, H. D. Interleukin-10 Therapy — Review of a New Approach. **Pharmacol Rev**, v. 55, n. 2, p. 241–269, 2003.

BANERJEE, P. S.; LAGERLÖF, O.; HART, G. W. Roles of O-GlcNAc in chronic diseases of aging. **Mol Aspects Med**, v. 51, p. 1–15, 2016.

BERGNER, A.; SANDERSON, M. J. Acetylcholine-induced calcium signaling and contraction of airway smooth muscle cells in lung slices. **J Gen Physiol**, v. 119, n. 2, p. 187–198, fev. 2002.

BORBA, C. S.; LEMOS, I. G. S.; HAYASIDA, N. M. A. Epidemiologia e fatores de risco cardiovasculares em jovens adultos: revisão da literatura. **Revista Saúde e Desenvolvimento Humano**, v. 31, n. 3, p. 51–60, 2015.

BORGES, T. T. et al. Conhecimento sobre fatores de risco para doenças crônicas: estudo de base populacional. **Caderno de Saúde Pública**, v. 25, n. 7, p. 1511–1520, 2009.

BRAUN, D. A.; FRIBOURG, M.; SEALFON, S. C. Cytokine response is determined by duration of receptor and signal transducers and activators of transcription 3 (STAT3) activation. **J Biol Chem**, v. 288, n. 5, p. 2986–2993, 2013.

BRONDELLO, J. M.; POUYSSÉGUR, J.; MCKENZIE, F. R. Reduced MAP kinase phosphatase-1 degradation after p42/p44MAPK-dependent phosphorylation. **Science**, v. 286, n. 5449, p. 2514–2517, 24 dez. 1999.

BUDZYN, K. et al. Segmental Differences in the Roles of Rho-Kinase and Protein Kinase C in Mediating Vasoconstriction. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 317, n. 2, p. 791–796, 2006.

CAHILL, P. A.; REDMOND, E. M. Vascular endothelium - Gatekeeper of vessel health. **Atherosclerosis**, v. 248, p. 97–109, 2016.

CAIRRÃO, E. et al. Isolation and culture of human umbilical artery smooth muscle cells expressing functional calcium channels. **In Vitro Cell Dev Biol Anim**, v. 45, n. 3, p. 175–184, 2009.

CARVALHO, M. C.; COLAÇO, A. L.; FORTES, Z. B. Citocinas, disfunção endotelial e resistência à insulina. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 50, n. 2, p. 304–312, 2006.

CHAUDHRY, A. et al. Interleukin-10 Signaling in Regulatory T Cells Is Required for Suppression of Th17 Cell-Mediated Inflammation. **Immunity**, v. 34, n. 4, p. 566–578, 2011.

CHEN, S. et al. Interleukin 10 attenuates neointimal proliferation and inflammation in aortic allografts by a heme oxygenase-dependent pathway. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 102, n. 20, p. 7251–7256, 2005.

CHI, H. et al. Dynamic regulation of pro- and anti-inflammatory cytokines by MAPK phosphatase 1 (MKP-1) in innate immune responses. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 7, p. 2274–2279, 2006.

CLARK, J. F.; PYNE-GEITHMAN, G. Vascular smooth muscle function: The physiology and pathology of vasoconstriction. **Pathophysiology**, v. 12, n. 1, p. 35–45, 2005.

CLARK, R. J. et al. Diabetes and the Accompanying Hyperglycemia Impairs Cardiomyocyte Calcium Cycling through Increased Nuclear O-GlcNAcylation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 45, p. 44230–44237, 2003.

COMMINS, S.; STEINKE, J. W.; BORISH, L. The extended IL-10 superfamily: IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, IL-28, and IL-29. **J Allergy Clin Immunol**, v. 121, n. 5, p. 1108–1111, 2008.

COMTESSE, N.; MALDENER, E.; MEESE, E. Identification of a nuclear variant of MGEA5, a cytoplasmic hyaluronidase and a beta-N-acetylglucosaminidase. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 283, n. 3, p. 634–640, 2001.

CONSIDINE, R. V. et al. Hexosamines regulate leptin production in human subcutaneous adipocytes. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 85, n. 10, p. 3551–3556, 2000.

DAOU, G. B.; SRIVASTAVA, A. K. Reactive oxygen species mediate Endothelin-1-induced activation of ERK1/2, PKB, and Pyk2 signaling, as well as protein synthesis, in vascular smooth muscle cells. **Free Radic Biol Med**, v. 37, n. 2, p. 208–215, 2004.

DONNELLY, R. P. et al. The expanded family of class II cytokines that share the IL-10 receptor-2 (IL-10R2) chain. **J Leukoc Biol**, v. 76, n. 2, p. 314–321, 2004.

DU, X. L. et al. Hyperglycemia inhibits endothelial nitric oxide synthase activity by

- posttranslational modification at the Akt site. **J Clin Invest**, v. 108, n. 9, p. 1341–1348, 2001.
- DUFF, J. L.; BERK, B. C.; CORSON, M. A. Angiotensin II stimulates the pp44 and pp42 mitogen-activated protein kinases in cultured rat aortic smooth muscle cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 188, n. 1, p. 257–264, 1992.
- EMILSSON, V. et al. Hexosamines and nutrient excess induce leptin production and leptin receptor activation in pancreatic islets and clonal beta-cells. **Endocrinology**, v. 142, n. 10, p. 4414–4419, 2001.
- EXEL, E.V. et al. Low Production Capacity of Interleukin-10 Associates With the Metabolic Syndrome and Type 2 Diabetes. **Diabetes**, v. 51, n. 4, p. 1088-1092, 2002.
- FEDERICI, M. et al. Insulin-dependent activation of endothelial nitric oxide synthase is impaired by O-linked glycosylation modification of signaling proteins in human coronary endothelial cells. **Circulation**, v. 106, n. 4, p. 466–472, 2002.
- FEITOSA, E. K. **Efeito do 1,8-cineol nos parâmetros de contratilidade do músculo liso traqueal e de mecânica do sistema respiratório de ratos expostos a fumaça do cigarro.** 2012. 131 f. Tese (mestrado em Ciências Fisiológicas) - Instituto Superior de Ciências Biomédicas, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza. 2012.
- FILLATREAU, S.; GRAY, D.; ANDERTON, S. M. Not always the bad guys: B cells as regulators of autoimmune pathology. **Nat Rev Immunol**, v. 8, n. 5, p. 391–397, 2008.
- FINBLOOM, D. S.; WINESTOCK, K. D. IL-10 induces the tyrosine phosphorylation of tyk2 and Jak1 and the differential assembly of STAT1 alpha and STAT3 complexes in human T cells and monocytes. **J Immunol**, v. 155, n. 3, p. 1079–1090, 1995.
- FIorentino, D. F.; BOND, M. W.; MOSMANN, T. R. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. **J Exp Med**, v. 170, n. 6, p. 2081–2095, 1989.
- FULLER, S. J. et al. Mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 inhibits the stimulation of gene expression by hypertrophic agonists in cardiac myocytes. **Biochem J**, v. 323, n. 2, p. 313–319, 1997.
- EGINAT, J. et al. The light and the dark sides of Interleukin-10 in immune-mediated diseases and cancer. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 30, n. 1, p. 87–93, 2016.
- GIACHINI, F. R. C. et al. Interleukin-10 attenuates vascular responses to endothelin-1 via effects on ERK1/2-dependent pathway. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 296, n. 2, p. 489–496, 2009.
- GLOCKER, E. O. et al. Inflammatory bowel disease and mutations affecting the interleukin-10 receptor. **N Engl J Med**, v. 361, n. 21, p. 2033–2045, 2009.
- GOLKS, A. et al. Requirement for O-linked N-acetylglucosaminyltransferase in lymphocytes

activation. **The EMBO journal**, v. 26, n. 20, p. 4368–4379, 2007.

GUNNETT, C. A. et al. Vascular effects of lipopolysaccharide are enhanced in interleukin-10-deficient mice. **Stroke**, v. 30, n. 10, p. 2191–2195, 1999.

GUNNETT, C. A. et al. IL-10 deficiency increases superoxide and endothelial dysfunction during inflammation. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 279, n. 4, p. 1555–1562, 2000.

GUSEV, N. B. Some properties of caldesmon and calponin and the participation of these proteins in regulation of smooth muscle contraction and cytoskeleton formation. **Biochemistry**, v. 66, n. 10, p. 1112–1121, 2001.

HADDAD, J. J.; FAHLMAN, C. S. Redox- and oxidant-mediated regulation of interleukin-10: an anti-inflammatory, antioxidant cytokine? **Biochem Biophys Res Commun**, v. 297, n. 2, p. 163–176, 2002.

HALL, J. et al. Mechanisms of agonist-induced constriction in isolated human mesenteric arteries. **Vascular pharmacology**, v. 44, n. 6, p. 427–433, 2006.

HAMMER, M. et al. Control of dual-specificity phosphatase-1 expression in activated macrophages by IL-10. **Eur J Immunol**, v. 35, n. 10, p. 2991–3001, 2005.

HART, G. W. et al. Cross Talk Between O-GlcNAcylation and Phosphorylation: Roles in Signaling, Transcription, and Chronic Disease. **Annu Rev Biochem**, v. 80, n. 2, p. 825–858, 2011.

HARTWECK, L. M.; SCOTT, C. L.; OLSZEWSKI, N. E. Two O-linked N-acetylglucosamine transferase genes of *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. have overlapping functions necessary for gamete and seed development. **Genetics**, v. 161, n. 3, p. 1279–1291, 2002.

HEBERT, L. F. et al. Overexpression of glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase in transgenic mice leads to insulin resistance. **Journal of Clinical Investigation**, v. 98, n. 4, p. 930–936, 1996.

HEESCHEN, C. et al. Serum level of the antiinflammatory cytokine interleukin-10 is an important prognostic determinant in patients with acute coronary syndromes. **Circulation**, v. 107, n. 16, p. 2109–2114, 2003.

HSIEH, T. J. et al. High glucose stimulates angiotensinogen gene expression via reactive oxygen species generation in rat kidney proximal tubular cells. **Endocrinology**, v. 143, n. 8, p. 2975–2985, 2002.

HU, P.; SHIMOJI, S.; HART, G. W. Site-specific interplay between O-GlcNAcylation and phosphorylation in cellular regulation. **FEBS Letters**, v. 584, n. 12, p. 2526–2538, 2010.

HU, Y. et al. Adenovirus-mediated overexpression of O-GlcNAcase improves contractile function in the diabetic heart. **Circulation research**, v. 96, n. 9, p. 1006–1013, 2005.

- HUTCHINS, A. P.; DIEZ, D.; MIRANDA-SAAVEDRA, D. The IL-10/STAT3-mediated anti-inflammatory response: Recent developments and future challenges. **Briefings in Functional Genomics**, v. 12, n. 6, p. 489–498, 2013.
- ISHIHATA, A.; TASAKI, K.; KATANO, Y. Involvement of p44/42 mitogen-activated protein kinases in regulating angiotensin II- and endothelin-1-induced contraction of rat thoracic aorta. **Eur J Pharmacol**, v. 445, n. 3, p. 247–256, 2002.
- JANSSEN, L. J. et al. Muscarinic excitation-contraction coupling mechanisms in tracheal and bronchial smooth muscles. **J Appl Physiol**, v. 91, n. 3, p. 1142–1151, 2001.
- JE, H. D. et al. Calponin is required for agonist-induced signal transduction--evidence from an antisense approach in ferret smooth muscle. **J Physiol**, v. 537, n. Pt 2, p. 567–577, 2001.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. [s.l.] Guanabara Koogan, 1999.
- KAESS, B. M. et al. Circulating Brain-Derived Neurotrophic Factor Concentrations and the Risk of Cardiovascular Disease in the Community. **J Am Heart Assoc**, v. 4, n. 3, p. e001544, 2015.
- KARAKI, H. et al. Calcium movements, distribution, and functions in smooth muscle. **Pharmacol Rev**, v. 49, n. 2, p. 157–230, 1997.
- KASSAN, M. et al. Interleukin-10 released by CD4(+)CD25(+) natural regulatory T cells improves microvascular endothelial function through inhibition of NADPH oxidase activity in hypertensive mice. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 31, n. 11, p. 2534–2542, 2011.
- KHAN, T. A. et al. Mitogen-activated protein kinase pathways and cardiac surgery. **J Thorac Cardiovasc Surg**, v. 127, n. 3, p. 806–811, 2004.
- KIM, E. J. Chemical Arsenal for the Study of O-GlcNAc. **Molecules**, v. 16, n. 3, p. 1987–2022, 2011.
- KNEASS, Z. T.; MARCHASE, R. B. Neutrophils exhibit rapid agonist-induced increases in protein-associated O-GlcNAc. **J Biol Chem**, v. 279, n. 44, p. 45759–45765, 2004.
- KNEASS, Z. T.; MARCHASE, R. B. Protein O-GlcNAc modulates motility-associated signaling intermediates in neutrophils. **J Biol Chem**, v. 280, n. 15, p. 14579–14585, 2005.
- KOHNO, M.; POUYSSEGUR, J. Pharmacological inhibitors of the ERK signaling pathway: application as anticancer drugs. **Prog Cell Cycle Res**, v. 5, n. 1, p. 219–224, 2003.
- KREPPEL, L. K.; HART, G. W. Regulation of a cytosolic and nuclear O-GlcNAc transferase. Role of the tetratricopeptide repeats. **The Journal of biological chemistry**, v. 274, n. 45, p. 32015–32022, 1999.
- LACZY, B. et al. Protein O-GlcNAcylation: a new signaling paradigm for the cardiovascular system. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 296, n. 1, p. 13–28, 2009.

LAZARUS, B. D.; LOVE, D. C.; HANOVER, J. A. Recombinant O-GlcNAc transferase isoforms: identification of O-GlcNAcase, yes tyrosine kinase, and tau as isoform-specific substrates. **Glycobiology**, v. 16, n. 5, p. 415–421, 2006.

LEHMAN, D. M. et al. A single nucleotide polymorphism in MGEA5 encoding O-GlcNAc-selective N-acetyl-beta-D glucosaminidase is associated with type 2 diabetes in Mexican Americans. **Diabetes**, v. 54, n. 4, p. 1214–1221, 2005.

LEINWEBER, B. D. et al. Extracellular regulated kinase (ERK) interaction with actin and the calponin homology (CH) domain of actin-binding proteins. **Biochem J**, v. 344, n. 1, p. 117–123, 1999.

LI, C. Y. et al. Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1: A critical phosphatase manipulating mitogen-activated protein kinase signaling in cardiovascular disease. **Int J Mol Med**, v. 35, n. 4, p. 1095–1102, 2015.

LIM, S. et al. Monitoring of intracellular tau aggregation regulated by OGA/OGT inhibitors. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 9, p. 20212–20224, 2015.

LIMA, V. V. et al. Increased vascular O-GlcNAcylation augments reactivity to constrictor stimuli – VASOACTIVE PEPTIDE SYMPOSIUM. **J Am Soc Hypertens**, v. 2, n. 6, p. 410–417, 2008.

LIMA, V. V. et al. O-GlcNAcylation: a novel post-translational mechanism to alter vascular cellular signaling in health and disease: focus on hypertension. **J Am Soc Hypertens**, v. 3, n. 5, p. 374–387, 2009.

LIMA, V. V. et al. O-GlcNAcylation: a novel pathway contributing to the effects of endothelin in the vasculature. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol**, v. 300, n. 2, p. 236–250, 2011.

LIMA, V. V. **Papel da O-glicosilação com N-acetil-glucosamina (O-GlcNAc) nas alterações vasculares associadas a altos níveis de endotelina-1**. 2012. 126 f. Tese (doutorado de Farmacologia) - Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto-SP, 2012.

LIMA, V. V. et al. O-GlcNAcylation and oxidation of proteins: is signalling in the cardiovascular system becoming sweeter? **Clinical Science**, v. 123, n. 8, p. 473–486, 2012.

LIMA, V. V. et al. Interleukin-10 limits increased blood pressure and vascular RhoA / Rho-kinase signaling in angiotensin II-infused mice. **Life Sciences**, v. 145, n. 1, p. 137–143, 2016.

LIMA, V. V.; TOSTES, R. 2012. **Alternating Phosphorylation with O-GlcNAc Modification: Another Way to Control Protein Function**, Protein Kinases, Dr. Gabriela Da Silva Xavier (Ed.), ISBN: 978-953-51-0640- 1, InTech, Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/protein-kinases/alternating-phosphorylation-with-o-glcna-modification-another-way-to-control-protein-function>

- LUBAS, W. .; HANOVER, J. . Functional expression of O-linked GlcNAc transferase. Domain structure and substrate specificity. **The Journal of biological chemistry**, v. 275, n. 15, p. 10983–10988, 2000.
- MA, X. et al. Regulation of IL-10 and IL-12 production and function in macrophages and dendritic cells. **F1000Research**, v. 4, n. 1, p. 1–13, 2016.
- MANNINO, M. H. et al. The paradoxical role of IL-10 in immunity and cancer. **Cancer Letters**, v. 367, n. 2, p. 103–107, 2015.
- MARIANA, M. R. **Efeito dos macrocíclos na regulação de funções vasculares**. 2013. 98 f. Tese (mestrado em Bioquímica) - Universidade da Beira Interior, Covilhã. 2013.
- MCCARRON, J. G. et al. The sarcoplasmic reticulum, Ca²⁺ trapping, and wave mechanisms in smooth muscle. **News Physiol Sci**, v. 19, p. 138–147, 2004.
- MCCLAIN, D. A. et al. Altered glycan-dependent signaling induces insulin resistance and hyperleptinemia. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 99, n. 16, p. 10695–10699, 2002.
- MIZUNO, Y. et al. Myosin light chain kinase activation and calcium sensitization in smooth muscle in vivo. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 295, n. 2, p. 358–364, 2008.
- MOLLOY, C. J.; TAYLOR, D. S.; WEBER, H. Angiotensin II stimulation of rapid protein tyrosine phosphorylation and protein kinase activation in rat aortic smooth muscle cells. **J Biol Chem**, v. 268, n. 10, p. 7338–7345, 1993.
- MOORE, K. W. et al. Pillars article: homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein-Barr virus gene BCRF1. **J Immunol**, v. 189, n. 5, p. 2072–2076, 1990.
- MOORE, K. W. et al. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annu Rev Immunol**, v. 19, n. 1, p. 683–765, 2001.
- MOSSER, D. M.; ZHANG, X. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. **Immunol Rev.**, v. 226, n. 1, p. 205–218, 2008.
- MOSTAFA, M. E. et al. Effects of interleukin-10 on monocyte/endothelial cell adhesion and MMP-9/TIMP-1 secretion. **Cardiovasc Res**, v. 49, n. 4, p. 882–890, 2001.
- MURRAY, P. J. The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration. **J Immunol**, v. 178, n. 5, p. 2623–2629, 2007.
- MUSLIN, A. J. MAPK signalling in cardiovascular health and disease: molecular mechanisms and therapeutic targets. **Clinical science**, v. 115, n. 7, p. 203–218, 2008.
- NGOH, G. A. et al. O-GlcNAc signaling in the cardiovascular system. **Circulation Research**, v. 107, n. 2, p. 171–185, 2010.
- NUNES, K. P.; RIGSBY, C. S.; WEBB, R. C. RhoA/Rho-kinase and vascular diseases: what

is the link? **Cell Mol Life S**, v. 67, n. 22, p. 3823–3836, 2010.

O'DONNELL, N. et al. Ogt-dependent X-chromosome-linked protein glycosylation is a requisite modification in somatic cell function and embryo viability. **Molecular and cellular biology**, v. 24, n. 4, p. 1680–1690, 2004.

OSEGUERA, C. A. V.; SPENCER, J. V. cmvIL-10 stimulates the invasive potential of MDA-MB-231 breast cancer cells. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, p. 88708, 2014.

PEREZ-ZOGHBI, J. F. et al. Ion channel regulation of intracellular calcium and airway smooth muscle function. **Pulm Pharmacol Ther**, v. 22, n. 5, p. 388–397, 2009.

PINDERSKI, O. L. J. et al. Interleukin-10 blocks atherosclerotic events in vitro and in vivo. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 19, n. 12, p. 2847–2853, 1999.

PUTOCZKI, T. L.; ERNST, M. STAT3-Activating Cytokines: A Therapeutic Opportunity for Inflammatory Bowel Disease? **J Interferon Cytokine Res**, v. 35, n. 5, p. 340–350, 2015.

QIAO, Y. . et al. Changes of regulatory T cells , transforming growth factor-beta and interleukin-10 in patients with type 1 diabetes mellitus : A systematic review and meta-analysis. **Clinical Immunology**, v. 170, n. 1, p. 61–69, 2016.

ROD, R. S.; STEPHENS, T. D.; TATE, P. **Anatomy & Physiology**. Education, McGraw-Hill Higher, 2003.

ROGACKA, D. et al. Expression of GFAT1 and OGT in Podocytes: Transport of Glucosamine and the Implications for Glucose Uptake into These Cells. **Journal of Cellular Physiology**, v. 225, n. 2, p. 577–584, 2010.

ROKOLYA, A.; SINGER, H. A. Inhibition of CaM kinase II activation and force maintenance by KN-93 in arterial smooth muscle. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 278, n. 3, p. 537–545, 2000.

ROSKOSKI, R. J. ERK 1/2 MAP kinases: Structure, function, and regulation. **Pharmacol Res**, v. 66, n. 2, p. 105–143, 2012.

ROSS, M. H.; KAYE, G. I.; PAWLINA, W. **Histology - A Text and Atlas**. [s.l.] Lippincott Williams & Wilkins, 2003.

RUIZ-CANELA, M.; BES-RASTROLLO, M.; MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, M. . The Role of Dietary Inflammatory Index in Cardiovascular Disease, Metabolic Syndrome and Mortality. **Int J Mol Sci**, v. 17, n. 8, p. 1265, 2016.

SABAT, R. et al. Biology of interleukin-10. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 21, n. 5, p. 331–344, 2010.

SAFAR, M. E.; BOUDIER, H. S. Vascular Development , Pulse Pressure , and the Mechanisms of Hypertension. **Hypertension**, v. 46, p. 205–209, 2005.

SAXENA, A. et al. Cytokine Interleukin-10 paradox: A potent immunoregulatory cytokine that has been difficult to harness for immunotherapy. **Cytokine**, v. 74, n. 1, p. 27–34, 2015.

SCHMITZ, U. et al. Angiotensin II stimulates p21-activated kinase in vascular smooth muscle cells: role in activation of JNK. **Circ Res**, v. 82, n. 12, p. 1272–8, 1998.

SETOGUCHI, M. et al. Stretch-activated whole-cell currents in smooth muscle cells from mesenteric resistance artery of guinea-pig. **J Physiol**, v. 501, n. 2, p. 343–353, 1997.

SHAFI, R. et al. The O-GlcNAc transferase gene resides on the X chromosome and is essential for embryonic stem cell viability and mouse ontogeny. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 11, p. 5735–5739, 2000.

SLAWSON, C.; COPELAND, R. J.; HART, G. W. O-GlcNAc signaling: a metabolic link between diabetes and cancer? **Trends in biochemical sciences**, v. 35, n. 10, p. 547–555, 2010.

SLAWSON, C.; HOUSLEY, M. P.; HART, G. W. O-GlcNAc cycling: how a single sugar post-translational modification is changing the way we think about signaling networks. **Journal of cellular biochemistry**, v. 97, n. 1, p. 71–83, 2006.

SMITH, D. A. et al. Serum levels of the antiinflammatory cytokine interleukin-10 are decreased in patients with unstable angina. **Circulation**, v. 104, n. 7, p. 746–749, 2001.

SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A. V. Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. **Physiol Rev**, v. 83, n. 4, p. 1325–1358, 2003.

SPIRO, R. G. Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. **Glycobiology**, v. 12, n. 4, p. 43–56, 2002.

STULL, J. T. Ca²⁺-dependent cell signaling through calmodulin-activated protein phosphatase and protein kinases minireview series. **J Biol Chem**, v. 276, n. 4, p. 2311–2312, 2001.

TAKAYASU, M. et al. A role of nitric oxide in vasomotor control of cerebral parenchymal arterioles in rats. **J Auton Nerv Syst**, v. 49, n. 1, p. 63–66, 1994.

TALLENT, M. K. et al. In Vivo Modulation of O -GlcNAc Levels Regulates Hippocampal Synaptic Plasticity through Interplay with Phosphorylation. **J Biol Chem**, v. 284, n. 1, p. 174–181, 2009.

TEDGUI, A.; MALLAT, Z. Anti-inflammatory mechanisms in the vascular wall. **Circ Res**, v. 88, n. 9, p. 877–887, 2001.

THUSEN, J. H. V. D. et al. Interleukins in Atherosclerosis: Molecular Pathways and Therapeutic Potential. **Pharmacol Rev**, v. 55, n. 1, p. 133–166, 2003.

TONG, J. et al. Phosphorylation and activation of RhoA by ERK in response to epidermal growth factor stimulation. **PLoS ONE**, v. 11, n. 1, p. 1–26, 2016.

TORRES, C. R.; HART, G. W. Topography and polypeptide distribution of terminal N-Acetylglucosamine residues on the surfaces of intact lymphocytes. **J Biol Chem**, v. 259, n. 5, p. 3308–3317, 1984.

VARKI, A. et al. **Essentials of Glycobiology**. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009.

VILA, E.; SALAICES, M. Cytokines and vascular reactivity in resistance arteries. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 288, n. 3, p. 1016–1021, 2005.

VOSELLER, K. et al. Elevated nucleocytoplasmic glycosylation by O-GlcNAc results in insulin resistance associated with defects in Akt activation in 3T3-L1 adipocytes. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 99, n. 8, p. 5313–5318, 2002.

WANCKET, L. M.; FRAZIER, W. J.; LIU, Y. Mitogen-activated protein kinase phosphatase (MKP)-1 in immunology, physiology, and disease. **Life Sciences**, v. 90, n. 7-8, p. 237–248, 2012.

WANG, Z.; GUCEK, M.; HART, G. W. Cross-talk between GlcNAcylation and phosphorylation: site-specific phosphorylation dynamics in response to globally elevated O-GlcNAc. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 37, p. 13793–13798, 2008.

WEBB, R. C. Smooth muscle contraction and relaxation. **Adv Physiol Educ**, v. 27, n. 1-4, p. 201–206, 2003.

WELLS, L. et al. Dynamic O-glycosylation of nuclear and cytosolic proteins: further characterization of the nucleocytoplasmic beta-N-acetylglucosaminidase, O-GlcNAcase. **The Journal of biological chemistry**, v. 277, n. 3, p. 1755–1761, 2002.

WELLS, L.; VOSELLER, K.; HART, G. W. Glycosylation of Nucleocytoplasmic Proteins: Signal Transduction and O-GlcNAc. **Science**, v. 291, n. 5512, p. 2376–2378, 2001.

WELLS, L.; WHELAN, S. A.; HART, G. W. O-GlcNAc: a regulatory post-translational modification. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 302, n. 3, p. 435–441, 2003.

WHELAN, S. A.; LANE, M. D.; HART, G. W. Regulation of the O-linked N-acetylglucosamine transferase by insulin signaling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 31, p. 21411–21417, 2008.

WILLIAMS, L. M. et al. Interleukin-10 suppression of myeloid cell activation--a continuing puzzle. **Immunology**, v. 113, n. 3, p. 281–292, 2004.

WOODSOME, T. P. et al. Expression of CPI-17 and myosin phosphatase correlates with Ca²⁺ sensitivity of protein kinase C-induced contraction in rabbit smooth muscle. **Journal of**

Physiology, v. 535, n. 2, p. 553–564, 2001.

WORTZEL, I.; SEGER, R. The ERK Cascade: Distinct Functions within Various Subcellular Organelles. **Genes Cancer**, v. 2, n. 3, p. 195–209, 2011.

WU, C. et al. BioGPS: an extensible and customizable portal for querying and organizing gene annotation resources. **Genome biology**, v. 10, n. 11, p. 130, 2009.

XIONG, Z.; SPERELAKIS, N. Regulation of L-type calcium channels of vascular smooth muscle cells. **J Mol Cell Cardiol**, v. 27, n. 1, p. 75–91, 1995.

XUAN, Y. et al. Association Between 3 IL-10 Gene Polymorphisms and Cardiovascular Disease Risk. **Medicine**, v. 95, n. 6, p. 1–11, 2016.

YAMAKAGE, M. et al. Different inhibitory effects of volatile anesthetics on T- and L-type voltage-dependent Ca²⁺ channels in porcine tracheal and bronchial smooth muscles. **Anesthesiology**, v. 94, n. 4, p. 683–693, 2001.

YANG, W. H. et al. NFκB activation is associated with its O-GlcNAcylation state under hyperglycemic conditions. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 105, n. 45, p. 17345–17350, 2008.

YOON, S. I. et al. Conformational changes mediate interleukin-10 receptor 2 (IL-10R2) binding to IL-10 and assembly of the signaling complex. **J Biol Chem**, v. 281, n. 46, p. 35088–35096, 2006.

YU, Y. et al. Differential Effects of an O-GlcNAcase Inhibitor on Tau Phosphorylation. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, p. 1–8, 2012.

ZACHARA, N. E. et al. Dynamic O-GlcNAc modification of nucleocytoplasmic proteins in response to stress. A survival response of mammalian cells. **J Biol Chem**, v. 279, n. 29, p. 30133–30142, 2004.

ZACHARA, N. E.; HART, G. W. O-GlcNAc modification: a nutritional sensor that modulates proteasome function. **TRENDS in Cell Biology**, v. 14, n. 5, p. 218–221, 2004.

ZEIDAN, Q.; HART, G. W. The intersections between O-GlcNAcylation and phosphorylation: implications for multiple signaling pathways. **J Cell Sci**, v. 123, n. 1, p. 13–22, 2010.

ZHANG, H. et al. Common variants in glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase 2 (GFPT2) gene are associated with type 2 diabetes, diabetic nephropathy, and increased GFPT2 mRNA levels. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 89, n. 2, p. 748–755, 2004.

ZHANG, Z. et al. O-GlcNAcase Expression is Sensitive to Changes in O-GlcNAc Homeostasis. **Frontiers in Endocrinology**, v. 5, n. 206, p. 1–8, 2014.

ZHAO, Q. et al. MAP kinase phosphatase 1 controls innate immune responses and suppresses endotoxic shock. **J Exp Med**, v. 203, n. 1, p. 131–140, 2006.

ZIMMERMAN, A. D.; HARRIS, R. B. S. In vivo and in vitro evidence that chronic activation of the hexosamine biosynthetic pathway interferes with leptin-dependent STAT3 phosphorylation. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 308, n. 3, p. 543–555, 2015.

8. ANEXO



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo Nº 23108.166477/2016-20, sobre “Papel da O-Glicosilação com N-Acetil-Glucosamina nas alterações vasculares via modulação de interleucina-10”, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. VICTOR VITORINO LIMA & Col.**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)-UFMT em reunião ordinária de **02/12/2016**.

CERTIFICATE

We certify that the protocol Nº 23108.166477/2016-20, entitled “O-GlcNAcylation contributes to augmented vascular reactivity induced by interleukin-10”, is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in the Use of Animals (Federal University of Mato Grosso – UFMT) on **Dec 02, 2016**.

Cuiabá-MT, 02 de dezembro de 2016.

Prof. Dr. Roberto Vilela Veloso
Presidente

Prof. Dr. Daniel Moura de Aguiar
Vice-Presidente