UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

CAMILA ZILIOOTTO ZANOTTO

Papel da *O*-glicosilação com *N*-acetil-glucosamina (*O*-GlcNAc) no influxo e recaptação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático em aorta de ratos: análise funcional

RIBEIRÃO PRETO

2013

CAMILA ZILIOTTO ZANOTTO

Papel da *O*-glicosilação com *N*-acetil-glucosamina (*O*-GlcNAc) no influxo e recaptação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático em aorta de ratos: análise funcional

Dissertação apresentada a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Rita de Cássia Aleixo Tostes Passaglia

Co-orientador: Prof. Dr. Victor Vitorino Lima

RIBEIRÃO PRETO

2013

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Zanotto, Camila Ziliotto

Papel da *O*-glicosilação com *N*-acetil-glucosamina (*O*-GlcNAc) no influxo e recaptção de cálcio pelo retículo sarcoplasmático em aorta de ratos: análise funcional. Ribeirão Preto, 2013. 74p., 30 cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Tostes, Passaglia, Rita de Cássia Aleixo

1. PugNAc. 2. Glicosilação. 3. Cálcio. 4. STIM1/Orai1. 5. Proteína cinase C.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Camila Ziliotto Zanotto

Papel da *O*-glicosilação com *N*-acetil-glucosamina (*O*-GlcNAc) no influxo e recaptação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático em aorta de ratos: análise funcional.

Dissertação apresentada a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Aprovado em: ____ / ____ / ____

Banca examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Com os pais que tenho, *Pedro e Joice*

Com a irmã que tenho, *Júlia*

Com a família que tenho, *Ziliotto Zanotto*

Com a orientadora que tenho, *Rita*

Com os amigos que tenho... ♥

Com tudo que tenho

Dedico esta dissertação

à todos que me inspiram a sonhar cada vez mais

...

à vida, pela sorte que tenho!

... *Força Santa Maria* ♥

Agradecimentos

A *Deus* e meu *anjinho da guarda* por estarem sempre comigo,

A minha maravilhosa família (ou as minhas famílias *Ziliotto Zanotto* e *Amaral Gomes*):

Meus pais, por tudo que me ensinaram e pelo apoio e incentivo incondicional, obrigada por nunca terem medido esforços para que meus sonhos se tornassem reais; *Minha irmã*, por ser uma parte de mim, meu tesouro; *Meus avós*, por me ensinarem a lutar e mostrar que a vida é boa a quem faz o bem; *Meus tios, tias, primos e primas*, por me apoiarem nas minhas decisões, sempre ao meu lado, com muito orgulho, amor, carinho e preocupação. A vocês: uma saudade inexplicável!

A minha orientadora Dra. *Rita Tostes*, pela demonstração de paixão à ciência, motivação, orientação diária e incansável, a quem devo grande parte da minha formação pessoal e científica. A sua compreensão, paciência, acolhimento e bondade. Professora Rita, obrigada por ser tão humana, por ser diferente, por ser a minha orientadora! Eu agradeço e agradecerei todos os dias por ter você.

Em especial, ao *Victor Vitorino Lima* e a *Fernanda Giachini*, que dedicaram seu tempo para boas conversas, principalmente nos momentos de desespero, pela orientação no desenvolvimento deste trabalho, acreditando em mim. Vocês são realmente muito especiais na minha vida. Minha admiração e gratidão por vocês é imensa. Victor, espero poder te fazer rir com minha risada e Fernanda, espero poder retribuir todo o carinho a altura.

As professoras Dra. *Lusiane Maria Bendhack* e Dra. *Cristina Antoniali Silva* pelas contribuições e disponibilidade em participar dessa banca de mestrado.

As minhas amigas *Carla* e *Larissa*, vocês são o pedacinho do meu Rio Grande do Sul aqui em Ribeirão Preto. Obrigada pelos momentos maravilhosos que me proporcionaram, as conversas e o apoio quando sempre precisei, obrigada por cuidarem de mim. Carla, você é meu exemplo de determinação e foco, minha guerreira!

Aos amigos *Karla Bianca* e *Rhéure*, eu gostaria de um dia poder retribuir todos os momentos maravilhosos e de descontração que passamos juntos, obrigada pelos momentos em que dividi meus sentimentos, por estarem sempre prontos a me ajudar, pelo companheirismo, pelas infinitas caronas no “nosso” carro, pra USP, pra casa, pro mercado, pro parque, pros aniversários, pras festas, pras compras, pras viagens... Vocês talvez nem imaginem o quão importantes são para mim. Tenho certeza que o futuro de vocês será brilhante!

Aos amigos de laboratório, *Carla, Fabíola, Fernando, Zidonia, Stêfany, Fernanda, Vania, Marcondes, Thiago Bruder, Thiago Dias, Karla, Rhéure, Camila, Nathanne, Maria, Lucas e Dani Antoniali*, sou grata pelo convívio diário com todos, vocês fazem deste laboratório um lar, obrigada por tudo (amizade, companheirismo, paciência, refeições diárias, experiências, ideias, ensinamentos, alegrias...). Vocês são muito especiais!

Aos amigos, *Rosana, Paula, Sara, Alejandro, Leandro, Aline, Gabi, Daniela, Junya, Laena, Alisson, Danielle, Felipe, Christiane, Geisa, Paola...* pela amizade, carinho, sorrisos e convívio durante este período em Ribeirão Preto. Em especial, aos amigos que fiz durante o XV Curso de Inverno de Farmacologia em 2009, vocês carimbaram o meu passaporte de retorno a este departamento.

Aos *amigos* que deixei na minha Santa Maria, as conversas, risadas, desejos de estarmos sempre juntos - vocês fazem a vida valer a pena. Apesar da distância, moram no meu coração!

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia, *José Waldik Ramon, Fátina Helena* e a querida *Soninha*, que sempre estiveram prontos a ajudar e dar suporte em todas as causas burocráticas desta caminhada.

Ao apoio financeiro da CAPES e CNPq.

Enfim, a todos que de alguma maneira contribuíram para esta caminhada, os meus mais sinceros agradecimentos,

Camila

*“E guardemos as certezas pelas próprias
dificuldades já superadas
que não há mal que dure para sempre”*
Chico Xavier

*“Nunca se afaste de seus sonhos, pois se eles se forem, você
continuara vivendo, mas terá deixado de existir”.*
Charles Chaplin

RESUMO

ZANOTTO, C.Z. **Papel da *O*-glicosilação com *N*-acetil-glucosamina (*O*-GlcNAc) no influxo e recaptção de cálcio pelo retículo sarcoplasmático em aorta de ratos: análise funcional.** 2013. 74 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

A *O*-glicosilação com *N*-acetil-glucosamina (*O*-GlcNAc) é uma modificação pós-translacional altamente dinâmica que modula diversas vias de sinalização. O processo de *O*-GlcNAc é controlado por duas enzimas: a enzima OGT é responsável por catalisar a adição de *N*-acetil-glucosamina no grupo hidroxila dos resíduos de serina e treonina, enquanto a OGA catalisa a remoção de *O*-GlcNAc das proteínas modificadas. Proteínas com importante papel na função vascular são alvo de *O*-GlcNAc e o aumento da expressão de proteínas modificadas por *O*-GlcNAc promove aumento da reatividade vascular para estímulos contráteis. Um dos mecanismos de extrema importância no controle do tônus vascular está ligado à regulação da concentração de cálcio (Ca^{2+}) intracelular, onde destacamos a participação do sistema STIM1/Orai1. As moléculas de interação estromal (STIM) atuam como sensores dos estoques intracelulares de Ca^{2+} e as proteínas Orai representam as subunidades que formam os canais de Ca^{2+} ativados pela liberação de Ca^{2+} (CRAC). Neste estudo investigamos a hipótese de que o aumento dos níveis vasculares de proteínas glicosiladas aumenta a resposta contrátil em aorta de ratos, por mecanismos relacionados ao controle da concentração intracelular de Ca^{2+} . Em nossos experimentos, utilizamos aortas torácicas de ratos incubadas com PugNAc (inibidor seletivo da OGA, 100 μM), por 24h. Utilizando protocolo experimental que permite avaliar contrações induzidas pelo influxo de Ca^{2+} e liberação de Ca^{2+} intracelular, demonstramos que a incubação com PugNAc aumentou a resposta contrátil à PE bem como a contração durante o período de influxo de Ca^{2+} , induzida pela reintrodução de solução fisiológica contendo Ca^{2+} (1,56 mM). O bloqueio dos canais CRAC com 2-APB (100 μM) e gadolínio (Gd^{3+} , 100 μM) diminuiu significativamente as contrações induzidas pelo influxo de Ca^{2+} em aortas incubadas com PugNAc. Além disso, estas aortas apresentaram aumento da expressão protéica de STIM1, o que resultaria em maior influxo de Ca^{2+} . A contração induzida por cafeína (20 mM) e serotonina (10 μM), a qual reflete a capacidade funcional do retículo sarcoplasmático

(RS) em captar Ca^{2+} , foi maior em aortas incubadas com PugNAc. O papel da Ca^{2+} -ATPase (SERCA) foi avaliado com a utilização de tapsigargina, bloqueador da SERCA. O efeito da tapsigargina foi semelhante em artérias incubadas com PugNAc e veículo, apesar do aumento de expressão proteica da SERCA em aortas incubadas com PugNAc. Como a proteína cinase C (PKC) é ativada por aumentos de Ca^{2+} intracelular, determinamos se a atividade de proteínas alvo da PKC estavam aumentadas. A incubação com PugNAc aumentou a expressão das formas fosforiladas da CPI-17, MYPT-1 e MLC. Em conjunto, estes resultados sugerem que a ativação de STIM1/Orai1, aumento da liberação de Ca^{2+} intracelular e ativação da via de sinalização da PKC podem representar mecanismos que modulam as alterações vasculares em resposta ao aumento de proteínas glicosiladas por *O*-GlcNAc.

Palavras-chaves: *O*-GlcNAc. PugNAc. Glicosilação. Cálcio. STIM1/Orai1. Proteína cinase C.

ABSTRACT

ZANOTTO, C.Z. **Effects of augmented *O*-GlcNAcylation on calcium influx and calcium uptake by the sarcoplasmic reticulum in the rat aorta: functional analysis.** 2013. 74 p. Dissertation (master), Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Glycosylation with *O*-linked β -*N*-acetyl-glucosamine (*O*-GlcNAc) is a highly dynamic post-translational modification. The process of *O*-GlcNAc is controlled by two enzymes: the OGT enzyme catalyses the addition of *N*-acetyl-glucosamine to the hydroxyl group of serine and threonine residues of a target protein, while OGA catalyzes the cleavage of *O*-GlcNAc from post-translationally-modified proteins. Proteins with an important role in vascular function are targets of *O*-GlcNAc and increased levels of proteins modified by *O*-GlcNAc increase vascular reactivity to contractile stimuli. The regulation of intracellular calcium (Ca^{2+}) concentration, including the activation of STIM1/Orai1, is key in the control of vascular tone. The stromal interaction molecules (STIM) act as sensors of intracellular Ca^{2+} stores whereas the Orai proteins represent subunits of the Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} channels (CRAC). We hypothesized that increased levels of vascular *O*-GlcNAc proteins augment vascular contractile responses by altering mechanisms that regulate the intracellular Ca^{2+} . Rat thoracic aortas were incubated with PugNAc (OGA selective inhibitor, 100 μM) for 24h. Using an experimental protocol that evaluates contractions induced by Ca^{2+} influx and release, we demonstrated that incubation with PugNAc increases contractile responses to phenylephrine (PE) as well as the contraction induced by Ca^{2+} influx, after depletion of intracellular Ca^{2+} stores. The CRAC channel blockers, 2-APB (100 μM) and gadolinium (Gd^{3+} , 100 μM), significantly reduced the contractions induced by Ca^{2+} influx in aortas incubated with PugNAc. Furthermore, these aortas showed increased STIM1 protein expression, which could result in increased influx of Ca^{2+} and, in turn, increase vascular contraction. The contraction induced by the release of intracellular Ca^{2+} stores, stimulated by caffeine (20 mM) and serotonin (10 μM), was increased in aortas incubated with PugNAc. The Ca^{2+} -ATPase (SERCA) inhibitor thapsigargin produced similar effects in arteries incubated with

PugNAc or vehicle, despite the increased SERCA protein expression in aortas incubated with PugNAc. Since PKC is activated by increases in intracellular Ca^{2+} and arteries incubated with PugNAc show activation of PKC, we determined whether the activity of proteins that are targets of PKC was increased in PugNAc-treated aortas. Incubation with PugNAc increased the expression of phosphorylated forms of CPI-17, MYPT-1 and MLC. Together, these results suggest that activation of STIM1/Orai1, increased release of intracellular Ca^{2+} and PKC activation may represent mechanisms that modulate vascular responses upon increased *O*-GlcNAc proteins.

Keywords: *O*-GlcNAc. PugNAc. Glycosylation. Calcium. STIM1/Orai1. Protein kinase C.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2-APB	Borato de 2-aminoetoxidifenil
ACh	Acetilcolina
ANOVA	Análise de variância
Ca²⁺	Cálcio
CETEA	Comissão de Ética em Experimentação Animal
CMLV	Célula de Músculo Liso Vascular
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CRAC	Canais de Ca ²⁺ ativados pela liberação de Ca ²⁺
DMEM	meio Eagle modificado por Dulbecco
DOCA	Acetato de desoxicorticosterona
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGTA	Ácido bis(2-aminoetil) etilenoglicol-N,N,N',N'-tetraacético
E_{max}	Efeito máximo produzido pelo agonista
EPM	Erro padrão da média
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ET-1	Endotelina-1
Gd³⁺	Gadolíneo
GFAT	Glutamina:frutose-6-fosfato aminotranferase
GlcNAc	N-acetil-glucosamina
IP₃	Trisfosfato de inositol
IP₃Rs	Receptores para inositol trisfosfato
L	Unidade de medida de volume - Litro

M	Unidade de concentração Molar
mg	Unidade de medida de massa - Miligrama
mL	Unidade de medida de volume - Mililitro
MLC	Cadeia leve de miosina
MLCK	Cinase da cadeia leve de miosina
MLCP	Fosfatase da cadeia leve de miosina
mM	Unidade de concentração molar - Milimolar
mN	Unidade de medida de força - Milinewton
MPTs	Modificações pós-translacionais
NCX	Trocador sódio-cálcio
O ou O₂	Oxigênio
OGA	β - <i>N</i> -acetilglucosaminidase ou <i>O</i> -GlcNAcase
<i>O</i>-GlcNAc	Glicosilação com <i>N</i> -acetil-glucosamina
OGT	<i>O</i> -GlcNAc transferase
PE	Fenilefrina
PIP3	fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato
PKC	Proteína cinase C
PMCA	Ca ²⁺ -ATPase da membrana plasmática
PugNAc	<i>O</i> -(2-aceta-mido-2-deoxy- <i>D</i> -glucopyranosylidene) amino- <i>N</i> -phenylcarbamate – inibidor da OGA
RE	Retículo endoplasmático
rpm	rotações por minuto
RS	Retículo sarcoplasmático
RyR	Receptores de rianodina
S	Enxofre

Ser	Serina
SERCA	Ca ²⁺ -ATPase do retículo sarcoplasmático
SHR	Ratos espontaneamente hipertensos
SOCE	Entrada de Ca ²⁺ operada por estoques
STIM1	Moléculas de interação estromal-1
Tre	Treonina
TRP	Canais dependentes de ligante
UDP-GlcNAc	Uridina 5'-difosfato- <i>N</i> -acetilglucosamina
VOC	Canais para Ca ²⁺ dependente de voltagem
WHO	World Health Organization
WKY	Ratos wistar kyoto
μM	Unidade de concentração Micromolar
VBH	Via de biossíntese da hexosamina

LISTA DE FÓRMULAS

CO₂	Dióxido de carbono
CH₃	Grupamento metil
CH₃CO	Grupamento acetila
C_m(H₂O)_n	Fórmula química empírica de sacarídeos
CaCl₂•2H₂O	Cloreto de cálcio diidratado
KCl	Cloreto de potássio
KH₂PO₄	Fosfato de potássio monobásico
MgSO₄•7H₂O	Sulfato de Magnésio Heptahidratado
NaCl	Cloreto de sódio
NaF	Fluoreto de sódio
Na₃VO₄	Ortovanadato de sódio
NaHCO₃	Bicarbonato de sódio

LISTA DE FIGURAS

Esquema 1. Esquema ilustrativo da hipótese de trabalho.	34
Tabela 1. Lista de anticorpos primários e respectivos anticorpos secundários.	44
Figura 1. Via de biossíntese da hexosamina.	23
Figura 2. Principais mecanismos envolvidos na regulação da concentração de Ca^{2+} intracelular no músculo liso.	27
Figura 3. Ativação do sistema STIM1/Orai1 como consequência da depleção dos estoques intracelulares de Ca^{2+}	29

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
<i>O</i> -GlcNAc	22
<i>O</i> -GlcNAc e doenças cardiovasculares.....	24
Regulação do Cálcio	25
2 HIPÓTESE.....	32
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35
4 ANEXO.....	41

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Dentre as doenças crônicas de maior impacto (doenças cardiovasculares, diabetes, câncer e doenças respiratórias crônicas), as doenças relacionadas ao sistema cardiovascular assumem atualmente uma importância única na sociedade, uma vez que representam a principal causa de morte no mundo, com estimativa de 17,5 milhões de mortes anuais, de acordo com a World Health Organization (WHO) ^[1].

As doenças cardiovasculares também acarretam perda de qualidade de vida com limitação nas atividades de trabalho e de lazer e tem alto impacto econômico para as famílias, comunidades e a sociedade em geral ^[1, 2]. Segundo a WHO, no ano de 2004 a hipertensão arterial liderou os casos de mortalidade no mundo, sendo responsável por 13% das mortes, seguida pelo consumo de tabaco (9%), hiperglicemia (6%), inatividade física (6%) e excesso de peso e obesidade (5%) ^[2].

O sistema cardiovascular é essencial para o transporte, distribuição e remoção das mais diversas substâncias nos tecidos do corpo. A distribuição de sangue para os tecidos é regulada principalmente pelo tônus vascular e pelos mecanismos que controlam e interferem diretamente com os processos de relaxamento e contração das células de músculo liso vascular (CMLV).

Em condições fisiológicas, o músculo liso vascular encontra-se parcialmente contraído (tônus vasomotor) sob a influência de vários tipos de sinais regulatórios, como neural, endotelial, humoral e miogênico ^[3]. Os componentes intrínsecos das CMLV, tais como receptores, canais iônicos e moléculas de sinalização, também participam diretamente dos processos de contração e relaxamento das CMLV. Desta maneira, um desequilíbrio na função destes componentes celulares pode levar à disfunção vascular.

Acrescentando mais complexidade à regulação do tônus das CMLV e, conseqüentemente, à modulação da função vascular, tem-se demonstrado que muitos dos componentes intrínsecos das CMLV podem sofrer modificações pós-translacionais (MPTs), ou seja, alterações catalisadas enzimaticamente em proteínas, após sua síntese, podendo ocorrer exclusão de resíduos ou a adição reversível de um pequeno grupamento químico. As MPTs afetam as propriedades físico-químicas das proteínas, ocasionando, por exemplo, mudança na atividade ou na localização de uma determinada proteína ^[4].

Entre as principais MPTs, podemos citar a fosforilação (adição do grupo fosfato – PO_4), acetilação (adição de um grupo acetila – CH_3CO), metilação (substituição de um hidrogênio por um grupo metil – CH_3), a formação de pontes dissulfeto [ligação entre dois átomos de enxofre (S)], ubiquitinação (marcação por moléculas de ubiquitina) e a glicosilação (adição de sacarídeos) ^[4-6]. Entre as MPTs, nosso laboratório tem interesse especial na glicosilação e em como esta modificação modula a função vascular.

Glicosilação é a adição enzimática de sacarídeos [também conhecidos como açúcares, carboidratos ou hidratos de carbono devido à fórmula química empírica $\text{C}_m(\text{H}_2\text{O})_n$] em sítios específicos de proteínas e lipídios ^[4].

A glicosilação é descrita como uma das mais frequentes e complexas MPTs. Mais de 50% de todas as proteínas podem ser glicosiladas em mamíferos ^[7]. A glicosilação tem muitas funções na célula: permite o correto modelamento de proteínas; confere estabilidade, pois algumas proteínas não glicosiladas são degradadas mais rapidamente; permite a adesão celular, como no caso das glicoproteínas de membrana que estão diretamente envolvidas nas funções biológicas dos linfócitos; e modula vias de sinalização intracelulares, uma vez que a glicosilação de proteínas pode aumentar ou inibir a atividade de diversas proteínas sinalizadoras ^[8, 9].

Há muitos tipos de glicosilação: *N*-glicosilação, onde carboidratos são ligados quimicamente ao nitrogênio das cadeias laterais da asparagina ou da arginina; *O*-glicosilação, onde os sacarídeos se ligam ao radical hidroxila das cadeias laterais de serina, treonina, tirosina, hidroxilisina, ou hidroxiprolina; *P*-glicosilação, onde o açúcar é ancorado ao fosfato de uma fosfo-serina; *C*-glicosilação, onde o carboidrato é ligado a um carbono da cadeia lateral do triptofano; formação de uma ancoragem de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (glipiação), onde um açúcar é ligado à fosfoetanolamina, à qual é ancorada ao grupo carboxil terminal de uma proteína ^[8, 9].

Os dois tipos mais comuns de glicosilação são *N*- e *O*-glicosilação. No entanto, grande interesse tem sido direcionado a uma forma incomum de glicosilação: a *O*-glicosilação com *N*-acetil-glucosamina (*O*-GlcNAc), em que um grupamento de *N*-acetil-glucosamina (açúcar simples) é adicionado no oxigênio da hidroxila (*O*) do carbono β de resíduos de serina (Ser) e treonina (Tre) de proteínas nucleares e citoplasmáticas ^[4, 7].

O-GlcNAc

Acreditava-se que as proteínas glicosiladas ao serem sintetizadas eram direcionadas para compartimentos luminais ou extracelulares. Em 1984, foi relatado pela primeira vez, por Torres e Hart, um novo tipo de glicosilação com o carboidrato *N*-acetil-glucosamina (GlcNAc) ligado a proteínas localizadas no citosol e organelas de diversos linfócitos ^[10]. Após este trabalho, surgiram maiores evidências que indicavam um papel funcional ou significado biológico para a ligação de *N*-acetil-glucosamina ao oxigênio da hidroxila (*O*) da cadeia lateral (carbono β) de alguns aminoácidos, a qual foi denominada em inglês *O-GlcNAcylation* ^[4], ou após tradução ao português *O-GlicoNAcilação* e que neste trabalho será doravante denominada/abreviada como *O-GlcNAc*.

A ligação do açúcar simples *N*-acetil-glucosamina a resíduos de Ser/Tre, via ligação com a hidroxila da cadeia lateral (carbono β) destes aminoácidos, é controlada diretamente pela atividade de duas enzimas altamente conservadas, *O*-GlcNAc transferase (OGT; uridina difosfo-*N*-acetil glucosamina; polipeptídeo β -*N*-acetilglucosaminil transferase ou UDP-NAc transferase) e β -*N*-acetilglucosaminidase (OGA ou *O*-GlcNAcase) ^[11-13].

A enzima OGT possui em seu sítio catalítico um domínio capaz de se ligar com a uridina 5'-difosfato-*N*-acetilglucosamina (UDP-GlcNAc). Desta forma, a OGT é responsável por catalisar a adição de GlcNAc no grupamento hidroxil de resíduos de Ser/Tre, levando à formação de proteínas glicosiladas por *O*-GlcNAc. A OGT é encontrada no citoplasma, mitocôndrias e, preferencialmente, no núcleo. A atividade da OGT é controlada pela concentração de UDP-GlcNAc, produto final da via de biossíntese da hexosamina (VBH) ^[14].

A VBH (Figura 1) consome uma pequena fração de glicose (menos que 5 %) do total de glicose metabolizada e uma maior disponibilidade de glicose favorece o fluxo para esta via. A VBH apresenta os primeiros dois passos em comum com a via glicolítica: primeiro a hexoquinase produz glicose-6-fosfato pela fosforilação da glicose, que é convertida em frutose-6-fosfato. A seguir, a via diverge e a frutose-6-fosfato, na VBH, é convertida em glucosamina-6-fosfato, pela enzima glutamina:frutose-6-fosfato aminotransferase (GFAT), utilizando glutamina como doador do grupamento amino. A GFAT é considerada a enzima/etapa limitante desta via. A glucosamina-6-fosfato é

convertida a N-acetil-glucosamina-6-fosfato que, por sua vez, culmina na formação de UDP-GlcNAc. Uma vez formado, UDP-GlcNAc atua como precursor da MPT de proteínas por *O*-GlcNAc^[14-16].

Por outro lado, a OGA está envolvida com a remoção hidrolítica de *O*-GlcNAc das proteínas que sofreram MPT^[17]. OGA possui uma distribuição nos tecidos semelhante à OGT, mas ao contrário da OGT, está localizada principalmente no citoplasma. A inibição da enzima OGA representa uma ferramenta útil no estudo dos efeitos de *O*-GlcNAc, uma vez que a inibição da OGA promove aumento de proteínas *O*-GlcNAc^[14].

Figura 1. Via de biossíntese da hexosamina. Enzimas envolvidas na via de formação do UDP-GlcNAc, a partir de glicose, glutamina ou glucosamina, culminando na formação de proteínas glicosiladas por *O*-GlcNAc. GFAT – glutamina:frutose-6-fosfato aminotransferase; OGT – *O*-GlcNAc transferase; OGA – *O*-GlcNAcase. Adaptado de Lima *et al.* Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol (2011)^[16] e Hanover *et al.* Biochim Biophys Acta (2010)^[15].

***O*-GlcNAc e doenças cardiovasculares**

Estudos recentes sugerem que proteínas importantes na função cardiovascular são alvos da *O*-GlcNAc. Níveis elevados de *O*-GlcNAc contribuem para a etiologia de diversas doenças que acometem uma grande parcela da humanidade, particularmente o diabetes. É importante ressaltar que os estudos sobre o *O*-GlcNAc no sistema vascular estão em fase bastante inicial. Consequentemente, muito deve ser explorado para descobrirmos a função da *O*-GlcNAcilação no sistema vascular e seu papel na disfunção vascular associada a doenças cardiovasculares e metabólicas.

No sistema vascular, a OGA, bem como a OGT, são expressas tanto em células endoteliais quanto em células do músculo liso. As alterações da expressão vascular destas enzimas tem sido relatadas na hiperglicemia/diabetes, envelhecimento e hipertensão arterial ^[4].

Yang *et al.* descreveram um mecanismo molecular pelo qual estímulos nutricionais podem regular a sinalização da insulina através de *O*-GlcNAc, contribuindo para a etiologia da resistência à insulina e diabetes tipo 2. Neste trabalho, foi demonstrado que, após a indução com insulina, o fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3) recruta a OGT a partir do núcleo para o citosol, formando um tipo de ligação, antes não reconhecido, OGT-PIP3. Esta ligação impede espacialmente a ligação PIP3-Akt, bloqueando a via de sinalização da insulina ^[18]. Trabalho de McClain *et al.* demonstrou que a superexpressão da OGT no tecido adiposo e muscular de camundongos induz resistência à insulina e hiperleptinemia, resultado de uma desregulação da via da hexosamina ^[19].

Estudos em nosso grupo demonstraram que o tratamento com inibidor seletivo da OGA (PugNAc 100 μ M, por 24 horas) aumenta o conteúdo global de proteínas *O*-GlcNAc, bem como promove aumento da resposta vascular a estímulos contráteis, como fenilefrina (PE) e serotonina ^[20], semelhante aos resultados obtidos após tratamento com ET-1. Em ratos hipertensos DOCA-sal, onde também encontramos este mesmo padrão de reatividade vascular, foi observado aumento do conteúdo vascular de proteínas *O*-GlcNAc, tanto em artérias de resistência do leito mesentérico quanto na aorta (leito de condutância) ^[21]. Usando CMLVs em cultura, foi demonstrado que a *O*-GlcNAc contribui para os efeitos vasculares da ET-1 via ativação do sistema RhoA/Rho-cinase. CMLVs estimuladas com ET-1 exibem aumento tempo-dependente

da expressão da forma fosforilada da subunidade 1 da miosina fosfatase (MYPT-1, alvo da Rho-cinase), de CPI-17, que inibe a enzima miosina fosfatase, e da cadeia leve de miosina (MLC₂₀), assim como da expressão e atividade de RhoA, e estes efeitos são mediados por aumento dos níveis de *O*-GlcNAc^[22].

Em concordância, Kim *et al.* observaram que glucosamina, a qual induz aumento de proteínas *O*-GlcNAc, aumenta a contração vascular estimulada com U46619, agonista tromboxano A₂, pelo aumento da fosforilação da MYPT-1 (Tre⁸⁵⁵), CPI-17, MLC₂₀ e atividade de RhoA. Os efeitos da glucosamina foram bloqueados pela inibição da OGT^[23]. Esses estudos indicam que a *O*-GlcNAcilação interfere de forma negativa com processos vasculares, principalmente na reatividade vascular, e que *O*-GlcNAc talvez tenha uma participação direta na disfunção vascular associada a diferentes patologias.

Regulação do Cálcio

Outro mecanismo extremamente importante no controle do tônus das CMLV está ligado à regulação da concentração de cálcio (Ca²⁺) intracelular, como discutido a seguir.

O íon Ca²⁺ possui um papel fundamental na regulação de inúmeros processos biológicos, incluindo respostas de curta duração como secreção, excitação, contração, bem como respostas de longa duração como transcrição, divisão celular, metabolismo e apoptose^[24]. Embora seja indispensável à manutenção da vida, um aumento prolongado na concentração deste íon pode levar a célula à morte. Todas as células eucarióticas possuem diversos mecanismos para controlar as concentrações de Ca²⁺ extra e intracelular.

A diferença na concentração de Ca²⁺ entre o citosol e o meio extracelular é em torno de 1/10.000, sendo a concentração no citosol aproximadamente 10⁻⁷-10⁻⁸ M e no meio extracelular 10⁻²-10⁻³ M. Este fato fascinante parece ter acontecido desde muito cedo na escala evolutiva, visto que várias reações metabólicas fazem uso de fosfato inorgânico (abundante no citosol) e que podem formar sais de Ca²⁺ com baixa solubilidade, levando a sua precipitação. Isto requereu, por um lado, o desenvolvimento de mecanismos de extrusão e sequestro especializados na remoção do Ca²⁺ livre do citosol, precisamente regulados. Por outro lado, a manutenção de concentrações

submicromolares de Ca^{2+} foi evolutivamente aproveitada com o aparecimento de um sistema de sinalização, baseado na elevação rápida de sua atividade citoplasmática e movido pelo enorme gradiente eletroquímico do íon estabelecido através das membranas celulares, sejam elas plasmáticas ou as das organelas [25, 26].

No interior da célula, os níveis de Ca^{2+} podem ser regulados de formas distintas (Figura 2), sendo dois os principais sistemas mobilizadores de Ca^{2+} nas células de músculo liso [27]:

1. Influxo de Ca^{2+} por meio de canais permeáveis ao Ca^{2+} presentes na membrana plasmática – canais para Ca^{2+} dependentes de voltagem (VOC), canais dependentes de ligantes (TRP) e canais para Ca^{2+} ativados pela liberação de Ca^{2+} (CRAC).

2. Liberação de Ca^{2+} de estoques intracelulares – na maioria das células a principal organela responsável por estocar o Ca^{2+} é o retículo endoplasmático (RE)* que apresenta em sua membrana duas famílias distintas de canais especializados na liberação de Ca^{2+} para o citosol, os receptores de rianodina (RyR) e os receptores de inositol 1,4,5-trisfosfato (IP_3Rs).

Neste trabalho avaliamos, por meio de experimentos funcionais, os efeitos do aumento nos níveis vasculares de *O*-GlcNAc sobre o influxo de Ca^{2+} por meio dos canais CRAC e sobre a liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares em CMLV. Investigamos também se o aumento de *O*-GlcNAc promove alterações nos mecanismos de regulação da concentração de Ca^{2+} que contribuem para a ativação dos canais CRAC em condições de depleção do retículo sarcoplasmático (RS)*.

Fisiologicamente, durante a contração muscular, quando as CMLV são estimuladas por um agonista contrátil (por exemplo, fenilefrina), ocorre um aumento bifásico na concentração de Ca^{2+} no citosol, resultando em contração celular. Este fato decorre da interação do agonista com seu receptor, levando a formação de trisfosfato de inositol (IP_3) e diacilglicerol (DAG). A contração inicial decorre do aumento da

*Diferenciando retículo endoplasmático (RE) do retículo sarcoplasmático (RS): o RE é uma organela altamente versátil e multifuncional presente em praticamente todas as células. O RE possui dois componentes: RE liso e RE rugoso. O RE liso tornou-se especializado principalmente em células musculares, nas quais recebeu a denominação de RS, onde possui como função primordial o sequestro de Ca^{2+} do citosol, auxiliando o controle da contração muscular [28]. O conceito de RS sempre foi considerado meramente como um nome alternativo para o RE no tecido muscular, porém novos estudos indicam que alterações funcionais possam existir entre RE e RS nas células musculares. Assim, com o avanço dos estudos no decorrer dos anos talvez será possível diferenciarmos estrutural e funcionalmente estes dois tipos de organelas.

concentração de Ca^{2+} intracelular por meio da ativação dos receptores para IP_3 pelo IP_3 , correspondente ao Ca^{2+} armazenado no RS. A segunda fase de aumento de Ca^{2+} requer Ca^{2+} extracelular. Quando os estoques intracelulares de Ca^{2+} são depletados, sinais do RS ativam canais de Ca^{2+} presentes na membrana plasmática e resultam no influxo de Ca^{2+} do meio extra para o intracelular. O mecanismo, no qual o RS atua como um capacitor, é conhecido como entrada de Ca^{2+} operada por estoques (SOCE, do inglês, *store-operated Ca^{2+} -entry*). SOCE inicia-se com a ativação de canais iônicos altamente seletivos ao Ca^{2+} e que funcionam independentemente de voltagem. Em muitos tipos celulares, SOCE resulta na ativação de uma corrente altamente seletiva ao Ca^{2+} , não voltagem-dependente, denominada corrente CRAC, que ocorre através da ativação de canais do tipo CRAC [29].

Figura 2. Principais mecanismos envolvidos na regulação da concentração de Ca^{2+} intracelular no músculo liso. VOC – canais para Ca^{2+} dependentes de voltagem; CRAC – canais de Ca^{2+} ativados pela liberação de Ca^{2+} ; RyR – receptores de rianodina; IP₃R – receptores de inositol 1,4,5-trisfosfato; SERCA – enzima Ca^{2+} -ATPase do RS; RS – retículo sarcoplasmático.

A fina regulação da concentração citosólica de Ca^{2+} é possível através dos mecanismos celulares envolvidos na modulação da entrada de Ca^{2+} , como descrito anteriormente, mas também por mecanismos envolvidos na extrusão deste íon do citosol, permitindo a manutenção do repouso celular ou o relaxamento muscular. O efluxo de Ca^{2+} ocorre via ativação das enzimas Ca^{2+} -ATPase da membrana plasmática (PMCA, do inglês, *plasma membrane Ca^{2+} -ATPase*) e Na^+ - K^+ -ATPase, além da atividade do trocador sódio-cálcio (NCX, do inglês, *sodium-calcium exchanger*) [30]. Outro mecanismo de extrema importância para diminuição dos níveis citosólicos de Ca^{2+} é a captação deste íon para o interior do RS pela ativação da enzima Ca^{2+} -ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA, do inglês, *sarco-endoplasmatic reticulum calcium ATPase*) [31], como será abordado com mais detalhes posteriormente.

Alterações nos mecanismos de regulação da concentração de Ca^{2+} intracelular são comumente descritos nas doenças relacionadas ao sistema cardiovascular, como na hipertensão arterial, por exemplo. Artérias de ratos espontaneamente hipertensos (SHR, do inglês, *spontaneously hypertensive rat*) apresentam aumento da sensibilidade contrátil ao Ca^{2+} extracelular [32]. A concentração basal citosólica de Ca^{2+} está aumentada nas CMLV de aorta de ratos SHR quando comparada à concentração citosólica basal em CMLV de ratos normotensos Wistar Kyoto (WKY) [33]. Nas mesmas condições, CMLV de aorta de ratos DOCA-sal exibem um aumento da concentração de Ca^{2+} intracelular enquanto que em células de ratos normotensos esta condição não é verificada [34].

Nas CMLV, o RS é o principal estoque intracelular de Ca^{2+} e atribui-se à enzima Ca^{2+} -ATPase do RS, também denominada SERCA, a primordial função de bomba de captação de Ca^{2+} do citosol para o interior do RS nas células musculares [31].

A liberação de Ca^{2+} de estoques intracelulares controla diversos processos celulares pela modulação de proteínas ligadoras de Ca^{2+} . Os canais liberadores de Ca^{2+} presentes no RS, como descrito anteriormente, são pertencentes a duas famílias: os receptores RyR e os IP_3 Rs, que atuam em resposta a uma variedade de estímulos e medeiam o efluxo do Ca^{2+} do RS para o citosol da célula.

A sinalização em condições de depleção do Ca^{2+} do RS envolve a ativação das moléculas de interação estromal-1 (STIM1), uma proteína descrita como um sensor de Ca^{2+} no RS, e Orai1, uma proteína que constitui os canais CRAC.

STIM1 está localizada no RS e, em condições onde o Ca^{2+} é depletado do RS, sofre rápida e reversível translocação para a membrana plasmática, onde irá se associar

a Orai1 (Figura 3). Ocorre a formação de um complexo entre o RS e a membrana plasmática (ou, mais especificamente, entre as proteínas STIM1 e Orai1) denominado “puncta”^[35].

Figura 3. Ativação do sistema STIM1/Orai1 como consequência da depleção dos estoques intracelulares de Ca^{2+} . Em condições basais, Orai1 encontra-se dimerizado na membrana plasmática e STIM1 encontra-se inativado no RS. Com a depleção dos estoques de Ca^{2+} do RS, STIM1 é ativado, se dimeriza e migra para a membrana plasmática. Dois dímeros de Orai1 se dimerizam entre si formando o poro funcional do canal CRAC. STIM1 e Orai1 interagem entre si, em uma formação denominada “puncta”, levando ao aumento dos níveis intracelulares de Ca^{2+} . Este aumento é sensível a SERCA, que promove captação deste íon para o RS, reabastecendo os estoques intracelulares de Ca^{2+} . Adaptado de Giachini *et al.* Braz J Med Biol Res (2011)^[35]

Inicialmente, foi demonstrado que a supressão da expressão de STIM1 em células S2 de *Drosophila*, reduzia significativamente a entrada de Ca^{2+} , em presença de tapsigargina, um bloqueador de Ca^{2+} -ATPase do RE^[36]. Tapsigargina estimula a depleção dos estoques intracelulares de Ca^{2+} , resultando no influxo contínuo de Ca^{2+} , via SOCE. A hiperexpressão de STIM1 em células Jurkat T aumenta a atividade dos canais CRAC, resultando em aumento no influxo de Ca^{2+} , via canais CRAC^[37].

A descoberta de STIM1 representou um grande avanço na compreensão de SOCE, porém a melhor compreensão dos mecanismos moleculares associados à função de STIM1 surgiu após a descoberta da proteína denominada Orai1, localizada na membrana plasmática [35, 38]. Demonstrou-se que a hiperexpressão de STIM1 e Orai1 aumentava significativamente a corrente CRAC. A expressão simultânea de STIM1 e Orai1 em células de *Drosophila* resultou em grande ganho na função SOCE e demonstrou que juntas essas proteínas eram capazes de mediar SOCE [39].

Dentre as inúmeras proteínas modificadas por *O*-GlcNAc com importante papel na função vascular, recentemente foi descrito que a proteína STIM1 é um alvo para *O*-GlcNAc. Zhu-Mauldin *et al.* (2012) em um elegante estudo descreveram que STIM1 é uma proteína alvo da *O*-GlcNAc em cardiomiócitos, pela imunoprecipitação de STIM1 de células tratadas com glucosamina (5 mM, por 1 hora) e células controle, seguido de imunoblot com anticorpo anti-*O*-GlcNAc. Também demonstraram que o aumento de proteínas *O*-GlcNAc previne a formação da interação entre STIM1 e Orai1, denominada “puncta”, atenuando a SOCE [40]. Estes resultados proporcionaram um elo entre *O*-GlcNAc e a sinalização de Ca^{2+} , visto o amplo papel da entrada de Ca^{2+} operado por estoques na concentração de Ca^{2+} intracelular, como já descrito anteriormente.

Por conhecermos os efeitos causados pelo aumento nos níveis de *O*-GlcNAc na vasculatura e visto a importância da sinalização STIM1/Orai1 na homeostasia intracelular de Ca^{2+} em CMLV, torna-se pertinente o estudo das consequências funcionais e celulares nos mecanismos de regulação da concentração intracelular de Ca^{2+} frente a aumento dos níveis de proteínas glicosiladas por *O*-GlcNAc.

Hipótese

2 HIPÓTESE

Considerando que:

- ✓ *O*-GlcNAc modula respostas vasculares a estímulos contráteis;
- ✓ *O*-GlcNAc ocorre em proteínas nucleares e citoplasmáticas;
- ✓ STIM1 é uma proteína alvo para *O*-GlcNAc;
- ✓ A sinalização da via STIM1/Orai1 é importante para a homeostasia intracelular de Ca^{2+} ;
- ✓ A concentração intracelular de Ca^{2+} é importante para as respostas vasculares a estímulos vasculares.

Formulamos a seguinte hipótese de trabalho:

*A elevação dos níveis vasculares de proteínas glicosiladas com N-acetilglucosamina (*O*-GlcNAc) promove aumento da resposta contrátil em aorta de ratos, por mecanismos relacionados ao controle dos níveis intracelulares de Ca^{2+} , onde destacamos a participação do sistema STIM1/Orai1. Além disso, propomos que alterações funcionais de proteínas que controlam a concentração intracelular de Ca^{2+} modulariam a atividade de proteínas dependentes de Ca^{2+} como, por exemplo, a proteína cinase C (PKC), o que também poderia contribuir para as alterações de reatividade vascular observadas com altos níveis de *O*-GlcNAc.*

Esquema 1. Esquema ilustrativo da hipótese de trabalho

Referências Bibliográficas

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. WHO, W.H.O., *Acessado em 18 de fevereiro de 2013*. 2013.
2. WHO, W.H.O., *Global health risks: mortality and burden of disease attributable to selected major* Geneva: World Health Organization, 2009.
3. Akata, T., *Cellular and molecular mechanisms regulating vascular tone. Part 2: regulatory mechanisms modulating Ca²⁺ mobilization and/or myofilament Ca²⁺ sensitivity in vascular smooth muscle cells*. J Anesth, 2007. **21**(2): p. 232-42.
4. Lima, V.V., Spitler, K., Choi, H., Webb, R. C., & Tostes, R. C. , *O-GlcNAcylation and oxidation of proteins: is signalling in the cardiovascular system becoming sweeter?* Clin Sci (Lond), 2012. **123**(8): p. 473-86.
5. Schjoldager, K.T. and H. Clausen, *Site-specific protein O-glycosylation modulates proprotein processing - deciphering specific functions of the large polypeptide GalNAc-transferase gene family*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1820**(12): p. 2079-94.
6. Hess, D.T. and J.S. Stamler, *Regulation by S-nitrosylation of protein post-translational modification*. J Biol Chem, 2012. **287**(7): p. 4411-8.
7. Zhang, Y., H. Yin, and H. Lu, *Recent progress in quantitative glycoproteomics*. Glycoconj J, 2012. **29**(5-6): p. 249-58.
8. Spiro, R.G., *Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds*. Glycobiology, 2002. **12**(4): p. 43R-56R.
9. Varki, A. and N. Sharon, *Historical Background and Overview*. 2009.
10. Torres, C.R. and G.W. Hart, *Topography and polypeptide distribution of terminal N-acetylglucosamine residues on the surfaces of intact lymphocytes. Evidence for O-linked GlcNAc*. J Biol Chem, 1984. **259**(5): p. 3308-17.
11. Zachara, N.E. and G.W. Hart, *Cell signaling, the essential role of O-GlcNAc!* Biochim Biophys Acta, 2006. **1761**(5-6): p. 599-617.
12. Hart, G.W., M.P. Housley, and C. Slawson, *Cycling of O-linked beta-N-acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins*. Nature, 2007. **446**(7139): p. 1017-22.
13. Zachara, N.E., K. Vosseller, and G.W. Hart, *Detection and analysis of proteins modified by O-linked N-acetylglucosamine*. Curr Protoc Mol Biol, 2011. **Chapter 17**: p. Unit 17 6.
14. Ngoh, G.A., et al., *O-GlcNAc signaling in the cardiovascular system*. Circ Res, 2010. **107**(2): p. 171-85.
15. Hanover, J.A., M.W. Krause, and D.C. Love, *The hexosamine signaling pathway: O-GlcNAc cycling in feast or famine*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1800**(2): p. 80-95.
16. 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, 2011. **300**(2): p. R236-50.

17. 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, 2009. **3**(6): p. 374-87.
18. Yang, X., et al., *Phosphoinositide signalling links O-GlcNAc transferase to insulin resistance*. Nature, 2008. **451**(7181): p. 964-9.
19. McClain, D.A., et al., *Altered glycan-dependent signaling induces insulin resistance and hyperleptinemia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(16): p. 10695-9.
20. Lima, V.V., et al., *Increased vascular O-GlcNAcylation augments reactivity to constrictor stimuli - VASOACTIVE PEPTIDE SYMPOSIUM*. J Am Soc Hypertens, 2008. **2**(6): p. 410-7.
21. Lima, V.V., et al., *Impaired vasodilator activity in deoxycorticosterone acetate-salt hypertension is associated with increased protein O-GlcNAcylation*. Hypertension, 2009. **53**(2): p. 166-74.
22. Lima, V.V., et al., *O-GlcNAcylation contributes to the vascular effects of ET-1 via activation of the RhoA/Rho-kinase pathway*. Cardiovasc Res, 2011. **89**(3): p. 614-22.
23. Kim do, H., et al., *Glucosamine increases vascular contraction through activation of RhoA/Rho kinase pathway in isolated rat aorta*. BMB Rep, 2011. **44**(6): p. 415-20.
24. Soboloff, J., et al., *STIM proteins: dynamic calcium signal transducers*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012. **13**(9): p. 549-65.
25. Bagnaresi, P., M.T. Rodrigues, and C.R. Garcia, *Calcium signaling in lizard red blood cells*. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol, 2007. **147**(3): p. 779-87.
26. Dodd, A.N., J. Kudla, and D. Sanders, *The language of calcium signaling*. Annu Rev Plant Biol, 2010. **61**: p. 593-620.
27. Hill-Eubanks, D.C., et al., *Calcium signaling in smooth muscle*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2011. **3**(9): p. a004549.
28. Michalak, M. and M. Opas, *Endoplasmic and sarcoplasmic reticulum in the heart*. Trends Cell Biol, 2009. **19**(6): p. 253-9.
29. Giachini, F.R., R.C. Webb, and R.C. Tostes, *STIM and Orai proteins: players in sexual differences in hypertension-associated vascular dysfunction?* Clin Sci (Lond), 2010. **118**(6): p. 391-6.
30. Gomez-Pinilla, P.J., et al., *Ca²⁺ extrusion in aged smooth muscle cells*. Biochem Pharmacol, 2007. **74**(6): p. 860-9.
31. Sumida, M., H. Okuda, and M. Hamada, *Ca²⁺,Mg²⁺-ATPase of microsomal membranes from bovine aortic smooth muscle. Identification and characterization of an acid-stable phosphorylated intermediate of the Ca²⁺,Mg²⁺-ATPase*. J Biochem, 1984. **96**(5): p. 1365-74.
32. Tostes, R.C., et al., *Calcium handling by vascular myocytes in hypertension*. Braz J Med Biol Res, 1997. **30**(3): p. 315-23.
33. Bendhack, L.M., R.V. Sharma, and R.C. Bhalla, *Altered signal transduction in vascular smooth muscle cells of spontaneously hypertensive rats*. Hypertension, 1992. **19**(2 Suppl): p. II142-8.

34. Tostes, R.C., et al., *The effects of cyclopiazonic acid on intracellular Ca^{2+} in aortic smooth muscle cells from DOCA-hypertensive rats*. Braz J Med Biol Res, 1997. **30**(2): p. 257-67.
35. Giachini, F.R., et al., *STIM1/Orai1-mediated store-operated Ca^{2+} entry: the tip of the iceberg*. Braz J Med Biol Res, 2011. **44**(11): p. 1080-7.
36. Roos, J., et al., *STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca^{2+} channel function*. J Cell Biol, 2005. **169**(3): p. 435-45.
37. Spassova, M.A., et al., *STIM1 has a plasma membrane role in the activation of store-operated Ca^{2+} channels*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(11): p. 4040-5.
38. Marchand, A., et al., *Calcium signaling in vascular smooth muscle cells: from physiology to pathology*. Adv Exp Med Biol, 2012. **740**: p. 795-810.
39. Prakriya, M., et al., *Orai1 is an essential pore subunit of the CRAC channel*. Nature, 2006. **443**(7108): p. 230-3.
40. Zhu-Mauldin, X., et al., *Modification of STIM1 by O-linked N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) attenuates store-operated calcium entry in neonatal cardiomyocytes*. J Biol Chem, 2012. **287**(46): p. 39094-106.
41. Karaki, H., H. Kubota, and N. Urakawa, *Mobilization of stored calcium for phasic contraction induced by norepinephrine in rabbit aorta*. Eur J Pharmacol, 1979. **56**(3): p. 237-45.
42. Giachini, F.R., et al., *STIM1/Orai1 contributes to sex differences in vascular responses to calcium in spontaneously hypertensive rats*. Clin Sci (Lond), 2012. **122**(5): p. 215-26.
43. Lytton, J., M. Westlin, and M.R. Hanley, *Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca-ATPase family of calcium pumps*. J Biol Chem, 1991. **266**(26): p. 17067-71.
44. Thastrup, O., et al., *Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca^{2+} stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(7): p. 2466-70.
45. Liou, J., et al., *STIM is a Ca^{2+} sensor essential for Ca^{2+} -store-depletion-triggered Ca^{2+} influx*. Curr Biol, 2005. **15**(13): p. 1235-41.
46. Liu, D.Y., et al., *Increased store-operated and 1-oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol-induced calcium influx in monocytes is mediated by transient receptor potential canonical channels in human essential hypertension*. J Hypertens, 2007. **25**(4): p. 799-808.
47. Fellner, S.K. and W.J. Arendshorst, *Store-operated Ca^{2+} entry is exaggerated in fresh preglomerular vascular smooth muscle cells of SHR*. Kidney Int, 2002. **61**(6): p. 2132-41.
48. Nishimaru, K., et al., *Endocardial endothelium-dependent positive inotropy by Ca^{2+} pump inhibitors: possible involvement of store-operated Ca^{2+} entry*. Pharmacology, 2007. **80**(4): p. 200-6.
49. Hardy, D., R. Tostes, and R. Webb, *O-GlcNAcylation augments protein kinase C mediated vasoconstriction (Abstract)*. Meeting Abstract Supplement - FASEB, 2010, April 24. **603.8**.

50. Salamanca, D.A. and R.A. Khalil, *Protein kinase C isoforms as specific targets for modulation of vascular smooth muscle function in hypertension*. *Biochem Pharmacol*, 2005. **70**(11): p. 1537-47.
51. Wynne, B.M., C.W. Chiao, and R.C. Webb, *Vascular Smooth Muscle Cell Signaling Mechanisms for Contraction to Angiotensin II and Endothelin-1*. *J Am Soc Hypertens*, 2009. **3**(2): p. 84-95.
52. Dong, D.L.-Y. and G.W. Hart, *Purification and Characterization of an O-GlcNAc Selective N-Acetyl-b-D-glucosaminidase from Rat Spleen Cytosol*. *The Journal of Biological Chemistry*, 1994. **269**(July 29): p. 19321-19330.
53. Macauley, M.S. and D.J. Vocadlo, *Increasing O-GlcNAc levels: An overview of small-molecule inhibitors of O-GlcNAcase*. *Biochim Biophys Acta*, 2010. **1800**(2): p. 107-21.
54. Lima, V.V., et al., *O-GlcNAcylation contributes to augmented vascular reactivity induced by endothelin 1*. *Hypertension*, 2010. **55**(1): p. 180-8.
55. Macauley, M.S., et al., *O-GlcNAcase uses substrate-assisted catalysis: kinetic analysis and development of highly selective mechanism-inspired inhibitors*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(27): p. 25313-22.
56. Masson, E., et al., *Glucosamine induces cell-cycle arrest and hypertrophy of mesangial cells: implication of gangliosides*. *Biochem J*, 2005. **388**(Pt 2): p. 537-44.
57. Chatham, J.C., et al., *Hexosamine biosynthesis and protein O-glycosylation: the first line of defense against stress, ischemia, and trauma*. *Shock*, 2008. **29**(4): p. 431-40.
58. Jones, S.P., et al., *Cardioprotection by N-acetylglucosamine linkage to cellular proteins*. *Circulation*, 2008. **117**(9): p. 1172-82.
59. Marsh, S.A., L.J. Dell'Italia, and J.C. Chatham, *Activation of the hexosamine biosynthesis pathway and protein O-GlcNAcylation modulate hypertrophic and cell signaling pathways in cardiomyocytes from diabetic mice*. *Amino Acids*, 2011. **40**(3): p. 819-28.
60. Ramirez-Correa, G.A., et al., *O-linked GlcNAc modification of cardiac myofilament proteins: a novel regulator of myocardial contractile function*. *Circ Res*, 2008. **103**(12): p. 1354-8.
61. Kim, H.S., et al., *Cardiac transcription factor Nkx2.5 is downregulated under excessive O-GlcNAcylation condition*. *PLoS One*, 2012. **7**(6): p. e38053.
62. Berridge, M.J., M.D. Bootman, and H.L. Roderick, *Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003. **4**(7): p. 517-29.
63. Choi, K.J., et al., *Caffeine and 2-Aminoethoxydiphenyl Borate (2-APB) Have Different Ability to Inhibit Intracellular Calcium Mobilization in Pancreatic Acinar Cell*. *Korean J Physiol Pharmacol*, 2010. **14**(2): p. 105-11.
64. Bai, D., et al., *Block of specific gap junction channel subtypes by 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB)*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2006. **319**(3): p. 1452-8.
65. Togashi, K., H. Inada, and M. Tominaga, *Inhibition of the transient receptor potential cation channel TRPM2 by 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB)*. *Br J Pharmacol*, 2008. **153**(6): p. 1324-30.

66. Maruyama, T., et al., *2APB, 2-aminoethoxydiphenyl borate, a membrane-penetrable modulator of Ins(1,4,5)P₃-induced Ca²⁺ release*. J Biochem, 1997. **122**(3): p. 498-505.
67. Escalada, A., et al., *Gadolinium inhibition of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activity in Torpedo electric organ*. Neurochem Res, 2004. **29**(9): p. 1711-4.
68. Lis, A., et al., *CRACM1, CRACM2, and CRACM3 are store-operated Ca²⁺ channels with distinct functional properties*. Curr Biol, 2007. **17**(9): p. 794-800.
69. Koenig, S., et al., *A TRPC3 blocker, ethyl-1-(4-(2,3,3-trichloroacrylamide)phenyl)-5-(trifluoromethyl)-1H-pyrazole-4-carboxylate (Pyr3), prevents stent-induced arterial remodeling*. J Pharmacol Exp Ther, 2013. **344**(1): p. 33-40.
70. Law, M., et al., *Structural requirements for the inhibition of calcium mobilization and mast cell activation by the pyrazole derivative BTP2*. Int J Biochem Cell Biol, 2011. **43**(8): p. 1228-39.
71. Mauban, J.R., et al., *Histamine-mediated increases in cytosolic [Ca²⁺] involve different mechanisms in human pulmonary artery smooth muscle and endothelial cells*. Am J Physiol Cell Physiol, 2006. **290**(2): p. C325-36.
72. Kiyonaka, S., et al., *Selective and direct inhibition of TRPC3 channels underlies biological activities of a pyrazole compound*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(13): p. 5400-5.
73. Schleifer, H., et al., *Novel pyrazole compounds for pharmacological discrimination between receptor-operated and store-operated Ca(2+) entry pathways*. Br J Pharmacol, 2012. **167**(8): p. 1712-22.
74. Watanabe, C., et al., *Mechanisms of caffeine-induced contraction and relaxation of rat aortic smooth muscle*. J Physiol, 1992. **456**: p. 193-213.
75. Shirinsky, V.P., et al., *Agonist-induced polyphosphoinositide breakdown in cultured human endothelial and vascular smooth muscle cells*. Health Psychol, 1988. **7 Suppl**: p. 61-74.
76. Budzyn, K., et al., *Segmental differences in the roles of rho-kinase and protein kinase C in mediating vasoconstriction*. J Pharmacol Exp Ther, 2006. **317**(2): p. 791-6.

Anexo

4 ANEXO

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

— Comissão de Ética em Experimentação Animal —

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 118/2011, sobre o projeto intitulado “*Participação da sinalização por beta-arrestina da ativação da via das MAPKs pela endotelina-1*”, sob a responsabilidade da **Professora Doutora Rita de Cássia Aleixo Tostes Tostes Passaglia** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi **APROVADO** em reunião de 26 de setembro de 2011.

(We certify that the protocol nº 118/2011, about “*Role of beta-arrestin in the activation of MAPKs signaling pathway by endothelin-1*”, agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the College of Medicine of Ribeirão Preto of the University of São Paulo – Ethical Commission of Ethics in Animal Research (CETEA) in 09/26/2011.

Ribeirão Preto, 26 de setembro de 2011.

Prof. Dr. Márcio Dantas
Presidente da Comissão de Ética em
Experimentação Animal