UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

**Papel da *O*-glicosilação com *N*-acetil-glucosamina (*O*-GlcNAc) nas alterações
vasculares associadas a altos níveis de endotelina-1**

Victor Vitorino Lima

Ribeirão Preto

2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

**Papel da O-glicosilação com *N*-acetil-glucosamina (O-GlcNAc) nas alterações
vasculares associadas a altos níveis de endotelina-1**

Victor Vitorino Lima

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Farmacologia

**Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rita de Cássia Aleixo
Tostes Passaglia**

Ribeirão Preto

2012

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.

Lima, Victor Vitorino

Papel da O-glicosilação com N-acetil-glucosamina (O-GlcNAc) nas alterações vasculares associadas a altos níveis de endotelina-1. Victor Vitorino Lima. Ribeirão Preto, 2012.

106 f.

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP / Área de Concentração: Farmacologia.

Orientadora: Tostes, Rita de Cássia Aleixo

1- O-Glicosilação-NAc. 2- Endotelina-1. 3- Reatividade Vascular.
4- Via de sinalização RhoA/Rho-cinase

LIMA, V.V. **Papel da O-glicosilação com N-acetil-glucosamina (O-GlcNAc) nas alterações vasculares associadas a altos níveis de endotelina-1.** Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, para obtenção de Doutor em Ciências.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Assinatura: _____

Dedico este trabalho a minha esposa Fernanda Giachini, pelo amor, companheirismo, incentivo, paciência e por me fazer enxergar e desejar sonhos maiores.

A minha orientadora Rita C. Tostes, pela amizade, confiança, oportunidade, inspiração e por me mostrar que, assim como a vida, a pesquisa é muito mais inspiradora quando realizada com ética, dedicação e amor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus que é o poder, o amor e a glória para sempre.

A minha esposa, Fernanda, que sempre esteve ao meu lado. Obrigado pela inspiração, orientação e crítica que tanto contribuíram para a realização deste sonho.

Aos meus pais José Vitorino e Terezinha de Lima que nunca mediram esforços em proporcionar-me a melhor educação intelectual e espiritual.

Aos meus irmãos, Aline e Júnior. Vocês são exemplos de educação e amizade. Vocês são muito especiais pra mim.

A minha nova família Casagrande Giachini: Ermes, Carmem e Eduardo por terem me acolhido como um filho.

A minha orientadora Dra. Rita Tostes pela orientação durante todas as etapas deste trabalho.

Expresso meus sinceros agradecimentos a banca examinadora pelas sugestões que contribuíram para o enriquecimento deste trabalho.

Ao Dr Clinton Webb pela oportunidade, o apoio financeiro, orientação e pelas valiosas sugestões que muito contribuíram para a conclusão dessa tese.

Aos companheiros do laboratório da Dra. Rita Tostes: Zidonia, Fernando, Karla, Camila, Carla, Thiago, Rhéure e Stêfane pela colaboração, ensinamento e agradável convívio.

Aos companheiros do laboratório do Dr Clinton Webb: Gisele, Theodora, Kenia, Hichan, Taka, Johanna, Kyan, Haroldo, Brandi, Chin-Wei, Cristal, Christine, David, Fernanda, Hiehun, Joe, Katie, Kyan e Saiprassad que de alguma forma contribuíram para o êxito deste trabalho.

Aos meus grandes amigos Fernando e Zidonia pelos momentos descontraídos que compartilhamos durante este período e pela nossa ótima parceria dentro e fora do laboratório.

Aos nossos companheiros do Georgia Health Sciences University: Mohamed Saleh, Dr. David M. Pollock e Dra. Adviye Ergul pela colaboração e ensinamento.

Às docentes do Grupo de Pesquisa de Diabetes e Hipertensão: Dra. Zuleica Bruno Fortes e Dra. Maria Helena Catelli de Carvalho pela colaboração e suporte acadêmico.

A secretária do departamento de Farmacologia, Soninha, pelo auxílio com os assuntos burocráticos.

RESUMO

LIMA, V.V. **Papel da O-glicosilação com *N*-acetil-glucosamina (O-GlcNAc) nas alterações vasculares associadas a altos níveis de endotelina-1.** 2012. 106 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

A O-Glicosilação com *N*-acetilglucosamina (O-GlcNAc) é uma modificação pós-traducional altamente dinâmica que modula diversas vias de sinalização. O processo de O-GlcNAc é controlado por duas enzimas: UDP-NAc transferase (OGT) e O-GlcNAcase (OGA). A enzima OGT catalisa a adição de *N*-acetil-glucosamina no grupo hidroxila dos resíduos de serina ou treonina das proteínas alvo. Por outro lado, a OGA catalisa a remoção hidrolítica de O-GlcNAc das proteínas modificadas. Proteínas com importante papel na função vascular são alvos da O-GlcNAc, e recentemente demonstramos que a expressão de proteínas modificadas com O-GlcNAc está aumentada em artérias de ratos com hipertensão DOCA-sal. Considerando que a produção de endotelina-1 (ET-1) encontra-se aumentada na vasculatura de diferentes modelos de hipertensão sensível ao sal, nós investigamos a hipótese de que o aumento da resposta vascular contrátil induzida pela ET-1 é decorrente da hiperativação da via RhoA/Rho cinase, mediada pelo aumento dos níveis de proteínas O-GlcNAc. Durante a realização de nossos experimentos, demonstramos que a exposição de aortas ou células do músculo liso vascular (CMLV) à ET-1 (0,1 $\mu\text{mol/L}$) aumenta a vasoconstrição para fenilefrina (PE) e serotonina, bem como os níveis de proteínas O-GlcNAc, além de modular a expressão das enzimas OGT e OGA. A infusão de ET-1 (2 pmol/Kg/min) por 14 dias também promoveu aumento dos níveis vasculares de proteínas O-GlcNAc e da resposta contrátil da aorta à PE. O tratamento de aortas ou CMLV com ST045849 (inibidor da OGT, 100 $\mu\text{Mol/L}$) ou atrasentan (antagonista do receptor ET_A , 1 $\mu\text{mol/L}$), preveniu o aumento dos níveis de proteínas O-GlcNAc induzido pela ET-1. Além disso, o tratamento com atrasentan por cinco semanas (atrasentan - 5 mg/kg/dia, por via oral) normalizou os níveis vasculares de proteínas O-GlcNAc em ratos DOCA-sal e também diminuiu a resposta contrátil da aorta à PE. A transfecção de CMLV com

siRNA para OGT aboliu o efeito da ET-1 sobre os níveis de proteínas O-GlcNAc. Considerando que o aumento nas contrações da aorta à PE, após o tratamento com PUGNAc (inibidor seletivo da OGA) ou ET-1, foi abolido pelo inibidor de Rho cinase (Y-27632, 1 μ mol/L) e que a ET-1 ativa a via de sinalização da RhoA/Rho cinase, decidimos investigar se aumento dos níveis de proteínas O-GlcNAc ativa/modula a via RhoA/Rho cinase. A incubação de CMLV com ET-1 não mudou a expressão protéica das formas totais de ROCK- α , ROCK- β , CPI-17, MYPT-1 ou MLC, porém aumentou a expressão das formas fosforiladas da MYPT-1 (Tre⁸⁵³), CPI-17 (Tre³⁸) e MLC (Tre¹⁸/Ser¹⁹). Estes efeitos não foram observados quando CMLV foram tratadas com ST045849, atrasentan ou previamente transfectadas com o siRNA para OGT. Também observamos que a ET-1 aumentou a atividade e a expressão protéica da RhoA, assim como a expressão da PDZ-Rho GEF e p115-Rho GEF. Este efeito foi abolido, quando CMLV foram previamente transfectadas com siRNA para OGT, incubadas com o inibidor da OGT ou tratadas com o antagonista de receptores ET_A. Em conclusão, nossos dados fornecem evidências de que a ET-1 aumenta os níveis vasculares de proteínas O-GlcNAc, resultando na ativação da via RhoA/Rho cinase e no aumento da reatividade vascular. É possível que o aumento de proteínas O-GlcNAc, induzido pela ET-1, possa representar um novo mecanismo para a disfunção vascular induzida por este potente peptídeo.

Palavras-chave: O-Glicosilação-NAc (O-GlcNAc). Endotelina-1. Reatividade vascular. Via de sinalização da RhoA/Rho cinase.

ABSTRACT

LIMA, V.V. **O-GlcNAcylation contributes to the vascular effects of ET-1 via activation of RhoA/Rho-kinase pathway.** 2012. 106 f. Ph.D. Thesis - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Glycosylation with O-linked β -N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) is a highly dynamic post-translational modification that plays a key role in signal transduction pathways. The cycling of O-GlcNAc is controlled by two enzymes: UDP-NAc transferase (OGT) and O-GlcNAcase (OGA). Whereas OGT catalyses the addition of O-GlcNAc to the hydroxyl group of serine and threonine residues of a target protein, OGA catalyses the hydrolytic cleavage of O-GlcNAc from post-translationally-modified target. Proteins with an important role in vascular function are targets for O-GlcNAcylation and we have recently shown that the vascular content of O-GlcNAc-proteins is augmented in arteries from DOCA-salt rats. Since endothelin-1 (ET-1) production is increased in the vasculature of salt-sensitive forms of hypertension, we tested the hypothesis that O-GlcNAc contributes to the vascular effects of ET-1, via activation of the RhoA/Rho-kinase pathway. Incubation of rat aortas or vascular smooth muscle cells (VSMCs) with ET-1 (0,1 μ mol/L) produced a time-dependent increase in O-GlcNAc levels, decreased expression of O-GlcNAc transferase (OGT) and β -N-acetylglucosaminidase (OGA), key enzymes in the O-GlcNAcylation process. Overnight treatment of aortas with ET-1 increased phenylephrine (PE) vasoconstriction. ET-1 effects were not observed when vessels were previously instilled with anti-OGT antibody or after incubation with an OGT inhibitor (ST045849, 100 μ mol/L). Aortas from DOCA-salt rats, which exhibit increased pre-pro-ET-1 expression, displayed increased contractions to PE and augmented levels of O-GlcNAc proteins. Treatment of DOCA-salt rats with atrasentan (ET_A antagonist) abrogated augmented vascular levels of O-GlcNAc and prevented increased PE vasoconstriction. Aortas from rats chronically infused with low rate of ET-1 (2 pmol/Kg/min, 14days) exhibited increased O-GlcNAc-proteins and enhanced PE responses. These changes are similar to those induced by PUGNAc (OGA inhibitor which increases O-GlcNAc levels). ET-1 as well as PUGNAc augmented contractions

to PE in endothelium-denuded rat aortas, an effect that was abolished by the Rho kinase inhibitor Y-27632 (1 μ mol/L). Incubation of VSMCs with ET-1 did not change expression of ROCK- α , ROCK- β , CPI-17, MYPT-1 or MLC, but increased phosphorylation levels of MYPT-1 (Thr⁸⁵³), CPI-17 (Thr³⁸) and MLC (Thr¹⁸/Ser¹⁹). The effects of ET-1 on MYPT-1, CPI-17 and MLC phosphorylation were prevented by the OGT inhibitor and OGT siRNA transfection, as well as by atrasentan. ET-1 increased RhoA expression and activity in VSMCs, and this effect was abolished by OGT siRNA transfection and OGT inhibition. ET-1 also augmented expression of PDZ-Rho GEF and p115-Rho GEF in VSMCs and this was prevented by OGT siRNA, OGT inhibition (ST045849) and ET_A receptor blockade (atrasentan, 1 μ mol/L). In conclusion, our data strongly suggest that ET-1 augments O-GlcNAc levels and this modification contributes to increase vascular contractile responses, via activation of the RhoA/Rho-kinase pathway. We speculate that the modulatory effect of ET-1 on O-GlcNAcylation may represent a novel mechanism underlying the vascular effects of the peptide.

Key words: O-GlcNAcylation (O-GlcNAc), Endothelin-1, Vascular reactivity, RhoA/Rho-kinase pathway.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Via de biosíntese de hexosamina.....	22
Figura 2. Interação entre O-GlcNAc e fosforilação de proteínas.	26
Figura 3. Estrutura das endotelinas.....	30
Figura 4. A incubação com ET-1 produziu aumento dos níveis vasculares de O-GlcNAc total, de forma tempo-dependente.	46
Figura 5. A incubação com ET-1 diminuiu a expressão protéica de OGT e OGA. ...	47
Figura 6. ET-1 e PUGNAc aumentaram a resposta vascular contrátil.....	50
Figura 7. A perfusão de ET-1, durante 14 dias, aumentou os níveis de proteínas O-GlcNAc em aortas e diminuiu a expressão vascular da OGA.	51
Figura 8. Os efeitos da ET-1 (24 horas) foram atenuados pela inibição seletiva da enzima OGT.....	54
Figura 9. A internalização de anticorpos contra a enzima OGT preveniu os efeitos da ET-1.....	55
Figura 10. O antagonista ET _A normalizou os níveis vasculares de proteínas O-GlcNAc e diminuiu a resposta contrátil da aorta à PE, em animais DOCA-sal.....	57
Figura 11. ET-1 aumentou os níveis vasculares de proteínas O-GlcNAc e seus efeitos vasculares foram prevenidos pelo antagonista dos receptores ET _A	58
Figura 12. A ET-1 produziu aumento tempo-dependente nos níveis de O-GlcNAc em CMLV.	60
Figura 13. Os efeitos vasculares da ET-1 e PUGNAc foram abolidos pelo inibidor da Rho cinase.	62

Figura 14. O efeito da incubação com ET-1 sobre os níveis de proteínas O-GlcNAc em CMLV foi prevenido pelo antagonista dos receptores ET _A , pela inibição seletiva da enzima OGT e pela transfecção com siRNA de interferência para OGT.	64
Figura 15. A transfecção com siRNA de interferência para OGT diminuiu a expressão desta enzima, na ausência e na presença de ET-1.....	65
Figura 16. A inibição seletiva da enzima OGT e o bloqueio dos receptores ET _A atenuaram o efeito da incubação com ET-1 sobre a via RhoA/Rho cinase.	67
Figura 17. A transfecção com siRNA de interferência para OGT preveniu os efeitos da ET-1 sobre a via RhoA/Rho cinase.....	68
Figura 18. O bloqueio dos receptores ET _A , a inibição seletiva da enzima OGT e a transfecção com siRNA de interferência para OGT preveniram o efeito da ET-1 no aumento da atividade e da expressão protéica da RhoA.	70
Figura 19. A incubação com ET-1, assim como o tratamento com atrasentan, a inibição seletiva da enzima OGT e a transfecção com siRNA OGT não alteraram a expressão da Rho GDI.....	72
Figura 20. O bloqueio dos receptores ET _A , a inibição seletiva da enzima OGT e a transfecção com siRNA OGT preveniram o efeito da ET-1 na expressão protéica de PDZ-Rho GEF e p115- Rho GEF.	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Lista de anticorpos primários e seus respectivos secundários.42

Tabela 2: Valores de $E_{\max}$ e pD_2 para fenilefrina em aortas de ratos com endotélio incubadas com ET-1 ou provenientes de ratos infundidos com ET-1.....49

Tabela 3: Pressão arterial sistólica, glicemia, peso corporal inicial e final dos ratos infundidos com ET-1 ou ratos DOCA-sal tratados com antagonista de receptores ET_A (atrasentan).....52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPc - Monofosfato cíclico de adenosina

AREs - Antagonistas dos receptores ET-1

Asp - Ácido aspártico

Ca²⁺ - Íons cálcio

CaCl₂·2H₂O - Cloreto de cálcio di-hidratado

CD31 - Molécula de adesão de plaquetas célula endotelial-1

CEUA - Comitê de Ética no Uso de Animais

cGK - proteína cinase dependente de GMPc

GMPc - 3'5' monofosfato cíclico de guanosina

Cis - Cisteína

CMLV - Células de músculo liso vascular

CO₂ - Dióxido de carbono

CPI-17 - Proteína inibitória da subunidade catalítica da miosina fosfatase

DAG - Diacilglicerol

DMEM - Meio Eagle modificado por Dulbecco

DOCA - Acetato de desoxicorticosterona

ECE1 - Enzima conversora de endotelina-1

E_{max} - Máximo efeito produzido pelo agonista

eNOS - Óxido nítrico sintase endotelial

EPM - Erro padrão da média

ET-1 - Endotelina-1

FDA - Food and Drug Administration

Fen - Fenilalanina

GDI - Inibidor da dissociação de guanina

GDP - Difosfato de guanosina

GFAT - Glutamina:frutose-6-fosfato transferase

Glu - Ácido glutâmico

GTP - Trifosfato de guanosina

VBH - Via de biosíntese de hexosamina

His - Histidina

IP3 - Trifosfato de inositol

IRS - Receptores de insulina

Iso - Isoleucina

KCl - Cloreto de potássio

KH₂PO₄ - Fosfato de potássico

Leu - Leucina

Lis - Lisina

MARCKS - substrato de cinase C rico em alanina miristolada

Met - Metionina

MLC - Miosina de cadeia leve

MgSO₄·7H₂O –Sulfato de magnésio heptahidrato

MYPT-1 - Subunidade regulatória da miosina fosfatase

NaCl - Cloreto de sódio

NAG-thiazoline - 1,2-dideoxi-2'-metil-alpha-dglucopiranosos[2,1-d]-Delta2'-thiazoline

NaHCO₃ - Bicarbonato de sódio

NFAT - Fator nuclear de células T ativadas

NF-κB - Fator nuclear kappa B

NO - Óxido nítrico

OGA - β-N-acetilglucosaminidase

O-GlcNAc - O-Glicosilação com N-acetilglucosamina

OGT - O-GlcNAc transferase

O₂ - Oxigênio

PAS - Pressão arterial sistólica

pD₂ - Logaritmo negativo da concentração molar que produz 50% da resposta máxima

PE - Fenilefrina

PI3K - Fosfoinositídeo 3-cinase

PKA - Proteína cinase A

PKC - Proteína cinase C

PLC - Fosfolipase C

PP1 - Proteína fosfatase-1

PP1c - Subunidade catalítica da fosfatase 1

Pré-pró-ET-1 - Pré-pró-endotelina-1

MPTs - Modificações pós-traducionais

PUGNAc - O-(2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranosylidene) amino-*N*-phenylcarbamate)

Ser - Serina

SERCA - Ca²⁺-ATPase do retículo sarcoplasmático

ST045849 - 3-(2-adamantanylethyl)-2-[(4-chlorophenyl)azamethylene]-4-oxo-1,3-thiazaperhyd roine-6-carboxylic acid

Rho GEFs - Fatores de troca GTP/GDP

ROCK-α - Rho cinase α

ROCK-β - Rho cinase β

Ter - Treonina

Tir - Tirosina

Trp - Triptofano

UDP-GlcNAc - Uridina 5'-difosfato-*N*-acetilglucosamina

UNI - Uninefrectomizados

Val - Valina

ZDF - Ratos obesos Zucker

5-HT - Serotonina

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO	20
1.1 - O-GlcNAc.....	21
1.1.1 - O-GlcNAc vs. O-fosforilação.....	24
1.1.2 - O-GlcNAc vs. doenças cardiovasculares.....	26
1.2 - Sistema Endotelina	30
1.3 - Via de sinalização da RhoA/Rho cinase	33
 2 – OBJETIVO GERAL.....	 36
2.1 - Objetivos específicos	36
 3 – MATERIAIS E MÉTODOS	 37
3.1 - Animais.	37
3.2 - Indução da hipertensão DOCA-Sal.....	37
3.3 - Infusão de baixas doses de ET-1.....	37
3.4 - Medida de pressão arterial.....	40
3.5 - Reatividade vascular.....	40
3.6 - Inibição da cascata de sinalização intracelular utilizando anticorpos em segmentos vasculares isolados.	39
3.7 - Cultivo de células de músculo liso vascular.	40
3.8 - Transfecção com RNA de interferência.	40
3.9 - Western blotting.	40
3.10 - Determinação da concentração sérica de glicose.....	43
3.11 - Atividade da RhoA.	43
3.12 - Extração de RNA, síntese de cDNA, transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase em tempo real.	43
3.13 - Análise estatística.	44

4 – RESULTADOS (Parte 1)	45
4.1 - Avaliação do efeito da ET-1 nos níveis vasculares de proteínas O-GlcNAc <i>in vitro</i>	45
4.2 - Avaliação do efeito da ET-1 nos níveis vasculares de proteínas O-GlcNAc <i>in vivo</i>	50
4.3 - Avaliação do efeito da ET-1 na presença de inibidores da via O-GlcNAc	53
4.4 - Avaliação do efeito da ET-1 nos níveis vasculares de proteínas O-GlcNAc durante a hipertensão DOCA-sal	56
5 – RESULTADOS (Parte 2)	59
5.1 - Avaliação do efeito vascular da ET-1 na presença de um inibidor da Rho cinase	59
5.2 - Avaliação do efeito da ET-1 na expressão das enzimas envolvidas na via da RhoA/Rho cinase em CMLV	66
6 – DISCUSSÃO	74
7 – CONCLUSÃO	86
8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90
ANEXOS	103
Anexo A - Declarações do comitê de ética e experimentação animal	103
Anexo B - Artigos publicados	106

1 – INTRODUÇÃO

O sistema cardiovascular é essencial para o transporte de hormônios, oxigênio e nutrientes para os tecidos e para a remoção dos produtos do metabolismo celular. Como a perfusão adequada é crucial para a sobrevivência, a distribuição de sangue para os tecidos é altamente regulada por mecanismos que controlam o tônus vascular, promovendo tanto o relaxamento, como a contração das células do músculo liso vascular (CMLV). A disfunção vascular, que é causada em parte por alterações na função das CMLV, está ligada a diversos distúrbios, incluindo diabetes, hipertensão arterial, síndromes metabólicas, doença renal crônica, isquemia miocárdica, insuficiência cardíaca congestiva, acidente vascular cerebral, retinopatia, disfunção erétil, câncer, entre outros (SAFAR *et al.*, 2005).

A regulação do tônus vascular ocorre por uma variedade de fatores, tais como: neurotransmissores, onde incluímos o sistema nervoso simpático e o sistema não-colinérgico não-adrenérgico; fatores hormonais, onde temos os hormônios do sistema renina-angiotensina, o fator natriurético atrial e o hormônio arginina vasopressina; fatores derivados do endotélio, como os fatores de contração (prostaglandinas, endotelina-1) e os fatores de relaxamento (óxido nítrico, prostaciclina); fatores derivados de células sanguíneas, como serotonina, histamina e citocinas; fatores locais, como os metabólitos e o tônus miogênico; bem como os componentes intrínsecos da CMLV.

Os componentes intrínsecos da CMLV, como receptores, canais iônicos e moléculas de sinalização, participam da contração e do relaxamento das CMLV. Desta maneira, o desequilíbrio na sinalização de mecanismos celulares, como por exemplo na via de sinalização da RhoA/Rho cinase, são considerados marcadores da disfunção vascular (SEKO *et al.*, 2003; NUNES *et al.*, 2010).

Acrescentando mais complexidade à regulação das CMLV, e conseqüentemente à função vascular, tem-se demonstrado que muitos dos componentes intrínsecos das CMLV estão sujeitos a modificações pós-traducionais (MPTs), ou seja, a adição reversível de um pequeno grupo químico, ocasionando uma mudança na atividade ou na localização de uma proteína de sinalização. As MPTs são consideradas importantes na regulação da atividade de proteínas, na interação de proteínas com efetores, na localização subcelular, na estabilidade, na

meia vida e outros aspectos da função protéica (WELLS *et al.*, 2001; HART *et al.*, 2007).

Existem diversos tipos de MPTs, tais como a acetilação (adição do grupo acetil através da acetiltransferase), a fosforilação (adição do grupo fosfato através da ação de uma cinase), a metilação (adição do grupo metil através da metiltransferase) e a glicosilação, a qual é definida como adição enzimática sítio-específica de sacarídeos em proteínas e lipídios (VARKI *et al.*, 2009; SPIRO 2002; TAYLOR *et al.*, 2006). A glicosilação exerce muitas funções em uma célula, onde destacam-se: controlar o dobramento correto de proteínas, pois algumas proteínas não assumem estruturas corretas, a menos que estejam glicosiladas; conferir estabilidade, considerando que algumas proteínas não glicosiladas são degradadas mais rapidamente; permitir a adesão entre células como por exemplo, as glicoproteínas de membrana que estão diretamente envolvidas nas funções biológicas dos linfócitos; modular vias de sinalização intracelulares, tendo em vista que a glicosilação de proteínas pode aumentar ou inibir a atividade de diversas proteínas sinalizadoras (VARKI *et al.*, 2009; SPIRO 2002; TAYLOR *et al.*, 2006).

Dentre os tipos de glicosilação, um grande interesse tem sido direcionado para a O-glicosilação com *N*-acetil-glucosamina (O-GlcNAc), a qual ocorre pela adição de um grupamento de *N*-acetil-glucosamina no oxigênio da hidroxila de resíduos de serina (Ser) e treonina (Tre). Várias proteínas citoplasmáticas e nucleares, incluindo cinases, fosfatases, fatores de transcrição, proteínas do citoesqueleto, entre outras, são alvos da O-GlcNAc (WELLS *et al.*, 2001; HART *et al.*, 2007; HART *et al.*, 1989; HOLT *et al.*, 1986; FULOP *et al.*, 2007). Evidências preliminares sugerem que níveis elevados da O-GlcNAc estão associados ao aumento da proliferação celular, comprometimento da função endotelial, inflamação e fibrose, os quais representam alterações características da disfunção vascular (LIMA *et al.*, 2008; LIMA VV *et al.*, 2009; LACZY *et al.*, 2009).

Estudos recentes sugerem que proteínas importantes na função cardiovascular são alvos da O-GlcNAc. Entretanto, poucos são os estudos que avaliam o impacto que o aumento dos níveis de O-GlcNAc exerce na função vascular. Sendo assim, decidimos desenvolver o presente trabalho, visando obter uma melhor compreensão dos mecanismos que contribuem para as alterações vasculares associadas ao aumento dos níveis de O-GlcNAc.

1.1 - O-GlcNAc

Identificada pela primeira vez por Torres e Hart, em 1984 (TORRES *et al.*, 1984), a O-GlcNAc é uma modificação pós-traducional altamente dinâmica que possui papel chave em vias de sinalização. Resultados recentes de estudos proteômicos, provenientes de diferentes laboratórios, sugerem que mais de 1500 proteínas são modificadas pela O-GlcNAc. Praticamente todas as classes de proteínas, incluindo fatores de transcrição, proteínas do citoesqueleto, proteínas do poro nuclear, proteínas associadas à cromatina, supressores tumorais, receptores hormonais, fosfatases e cinases são alvo da O-GlcNAc (HART *et al.*, 2007; LACZY *et al.*, 2009; LIMA *et al.*, 2011; LIMA *et al.*, 2009). Esta modificação modula a transcrição de proteínas tanto positiva como negativamente, dependendo do fator de transcrição e moduladores envolvidos.

Um banco de dados de proteínas e sítios alvos da O-GlcNAc, o dbOGAP, foi recentemente criado e se baseia, principalmente, na literatura publicada desde quando esta modificação foi descrita pela primeira vez. O banco de dados contém atualmente aproximadamente 800 proteínas associadas à O-GlcNAc (J. WANG *et al.*, 2011). Um sistema de previsão de sítios glicosilados (O-GlcNAcScan) com base em quase 400 sítios alvos, também foi desenvolvido (ZHANG ZHI HU 2010).

O processo de O-GlcNAc é controlado diretamente pela atividade de duas enzimas: a 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). A enzima OGT catalisa a adição de *N*-acetil-glucosamina no grupo hidroxila dos resíduos de Ser e Tre das proteínas alvo. Por outro lado, a OGA catalisa a remoção hidrolítica de O-GlcNAc das proteínas (LIMA VV *et al.*, 2009; LACZY *et al.*, 2009). A atividade catalítica da OGT é controlada pela concentração do seu substrato, uridina 5'-difosfato-*N*-acetilglucosamina (UDP-GlcNAc). A concentração de UDP-GlcNAc é altamente sensível ao fluxo de nutrientes tais como: glicose, ácidos graxos e aminoácidos (HANOVER *et al.*, 2010), através da via de biosíntese de hexosamina (VBH- Figura 1) (LACZY *et al.*, 2009; LOVE *et al.*, 2005; ZACHARA *et al.*, 2006; WELLS *et al.*, 2003).

Figura 1. Via de biosíntese de hexosamina. A ilustração demonstra as enzimas envolvidas na síntese de UDP-GlcNAc a partir da glicose e glucosamina e, consequentemente, estimulando a modificação de proteínas O-GlcNAc. Muitos sítios de fosforilação também são alvos para a O-GlcNAc, e a ocupação recíproca destes sítios pode levar a ativação diferencial de uma determinada proteína. **Fonte:** Victor V. Lima, Fernanda R. Giachini, David M. Hardy, R. Clinton Webb, Rita C. Tostes. O-GlcNAcylation: a novel pathway contributing to the effects of endothelin in the vasculature. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, V. 2, p. R236-50, 2011.

O aumento do fluxo na via VBH ocorre, principalmente através da maior disponibilidade de glicose ou pelo tratamento com glucosamina, a qual é metabolizada pela enzima glutamina:frutose-6-fosfato amidotransferase (GFAT), resultando no aumento da produção de UDP-GlcNAc e, consequentemente, estimulando a modificação de proteínas O-GlcNAc. A GFAT converte frutose 6-fosfato em glucosamina 6-fosfato, utilizando glutamina como doador do grupamento amino (Figura 1). Estima-se que 2-5% do total de glicose celular seja canalizado

para a via VBH (HART *et al.*, 2007; HANOVER *et al.*, 2010; BUTKINAREE *et al.*, 2009), embora o fluxo de glicose seja potencialmente diferente em vários tipos celulares. Os ácidos graxos também aumentam o fluxo da via VBH, porém nestes casos, o aumento se deve pela inibição da glicólise, resultando na elevação dos níveis de frutose-6-fosfato. Além disso, a acetil-CoA, produzida pelo metabolismo dos ácidos graxos, serve como o doador para a acetilação da glucosamina na formação da UDP-GlcNAc (P. HU *et al.*, 2010; J. WANG *et al.*, 1998). Como a atividade da OGT é extremamente sensível à concentração do substrato UDP-GlcNAc, a O-GlcNAc pode atuar como um sensor do estado metabólico da célula, o que justifica a frequente correlação entre os níveis de O-GlcNAc e a sobrevivência celular, induzida por diversas formas de estresse celular (CHATHAM *et al.*, 2008; NGOH *et al.*, 2008; ZACHARA *et al.*, 2004).

A enzima OGT é uma proteína solúvel encontrada no citosol, mitocôndrias e, preferencialmente, no núcleo (LUBAS *et al.*, 2000). Três isoformas distintas da OGT foram identificados (LUBAS *et al.*, 2000; LAZARUS *et al.*, 2006; KREPPEL *et al.*, 1999); duas subunidades de 110-kDa e uma subunidade de 78 kDa, a qual pode formar multímeros, e menores isoformas mitocondriais (LUBAS *et al.*, 2000; LAZARUS *et al.*, 2006; KREPPEL *et al.*, 1999). Estas isoformas contêm um domínio catalítico C-terminal com diferentes números de repetições tetratricopeptídicas dentro de seus domínios N-terminal. As repetições tetratricopeptídicas servem como um modulador de interação proteína-proteína, como ocorre por exemplo na interação da OGT com a proteína fosfatase-1 (PP1) (IYER *et al.*, 2003; WELLS *et al.*, 2004).

A OGA foi inicialmente identificada como hexosaminidase C. No entanto, a atividade da OGA é específica para *N*-acetil- β -D-glucosaminídes e, ao contrário das hexosaminídes, tem pH ótimo próximo ao neutro (LACZY *et al.*, 2009) e uma localização, principalmente, citosólica (DONG *et al.*, 1994). A enzima OGA parece usar a catálise de um substrato, envolvendo o grupo 2-acetamido (MACAULEY *et al.*, 2005) e contém um domínio de glicosidase N-terminal e um domínio de histonas acetiltransferase C-terminal (TOLEMAN *et al.*, 2004).

Assim como a OGT, a enzima OGA pode interagir com proteínas específicas, incluindo proteína fosfatase-2B (WELLS *et al.*, 2002). Duas isoformas distintas da OGA foram descritas; uma variante de 130 kDa e uma de 75 kDa, que diferem pelo C-terminal. A variante de 130 kDa ou "OGA longa" contém o domínio de glicosidase

N-terminal e o domínio de histonas acetiltransferase C-terminal bem distintos, já a porção de 75-kDa ou "OGA curta" não possui o domínio C-terminal (LIMA *et al.*, 2011). A grande importância na existência dessas duas isoformas, em aspectos experimentais, se deve ao fato de apresentarem uma sensibilidade distinta, frente aos inibidores farmacológicos da OGA. Por exemplo, a OGA curta apresenta uma certa resistência ao PUGNAc ([*O*-(2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranosylidene) amino-*N*-phenylcarbamate]) e ao NAG-thiazoline (1,2-dideoxi-2'-metil- α -dglucopiranosos[2,1-d]-Delta2'-thiazoline), mas é muito sensível a α -GlcNAc tiolsulfonato (KIM *et al.*, 2007). A inibição das enzimas OGT e OGA representa uma ferramenta de grande importância nos estudos desta modificação pós-traducional, a qual tem merecido destaque em razão das recentes descobertas acerca de sua importância.

1.1.1 - O-GlcNAc vs. O-fosforilação

A O-GlcNAc é considerada uma modificação pós-traducional similar à fosforilação de proteínas, considerando que ambas ocorrem em resíduos de Ser e Tre, representam processos dinâmicos envolvidos na sinalização celular e alteram a função das proteínas modificadas. Entretanto, Hu e colaboradores demonstraram evidências que, apesar de apresentarem muitas propriedades semelhantes, estas duas modificações são reguladas de modo muito diferentes (P. HU *et al.*, 2010). Várias cinases e fosfatases específicas, codificadas por genes distintos, regulam a fosforilação. Em contraste, como discutido anteriormente, a O-GlcNAc é controlada exclusivamente por duas enzimas, OGT e OGA, que são codificadas por um único gene altamente conservado em animais (HARTWECK *et al.*, 2002).

Muitos sítios de fosforilação também são alvos para a O-GlcNAc, e esta ocupação recíproca pode modificar a atividade ou alterar a estabilidade da proteína alvo (HART *et al.*, 1989; KAMEMURA *et al.*, 2003; COMER *et al.*, 2001) (Figura 1). Reforçando esta hipótese, Lee e colaboradores demonstraram o efeito da inibição de cinases e fosfatases nos níveis de O-GlcNAc, em algumas proteínas. Neste estudo, a ativação da proteína cinase C (PKC) e da proteína cinase A (PKA) reduziram os níveis de glicosilação em uma fração protéica associada ao citoesqueleto. Por outro lado, inibidores da PKC e PKA elevaram os níveis de O-

GlcNAc nesta fração (GRIFFITH *et al.*, 1999). Nesta mesma direção, foi demonstrado, tanto em tecidos vasculares como em tecido peniano de animais diabéticos ou tratados com PUGNAc, que a modificação da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) pela O-GlcNAc está associada à diminuição da fosforilação desta enzima no resíduo de Ser¹¹⁷⁷ (eNOS Ser¹¹⁷⁷), inibindo sua atividade e, consequentemente, diminuindo a função endotelial (DU *et al.*, 2001; MUSICKI *et al.*, 2005; CHEN *et al.*, 2007).

A interação entre fosforilação e O-GlcNAc, onde ambas competem pelo mesmo sítio na proteína alvo, é denominado como hipótese de "yin-yang" e tem sido relatada em uma variedade de proteínas (HART *et al.*, 1995). Entretanto, deve ser enfatizado que as interações entre estas duas MPTs nem sempre é pelo mesmo sítio. Algumas proteínas podem ser concomitantemente fosforiladas e glicosiladas, em sítios distantes. Em outras proteínas, tais como a p53 (W. H. YANG *et al.*, 2006) e vimentina (Z. WANG *et al.*, 2007), pode ocorrer uma interação entre estas duas MPTs em sítios adjacentes, nestes casos uma modificação pode regular a ocorrência da outra.

Além das interações entre O-GlcNAc e fosforilação, já mencionadas, estas duas modificações também influenciam uma a outra, por regularem a atividade ou a localização das enzimas envolvidas nestes dois ciclos (Figura 2). Por exemplo, a OGT forma um complexo estável e ativo com a proteína fosfatase-1 (PP1 β e PP1 γ) (WELLS *et al.*, 2004). Esta associação entre OGT e PP1 é particularmente interessante, pois pode representar um mecanismo direto pela qual a O-GlcNAc promove a desfosforilação de substratos específicos.

Por fim, a interação entre as modificações de glicosilação e fosforilação pode ocorrer pela fosforilação na tirosina (Figura 2). Com base na maior prevalência de fosforilação em resíduos de tirosina dentre as proteínas modificadas pela O-GlcNAc (aproximadamente, 68% vs 2% em proteínas não glicosiladas), Mishra e colaboradores sugeriram que a fosforilação nos resíduos de tirosina também desempenha um papel relevante nesta complexa e extensa interação entre estes dois processos (MISHRA *et al.*, 2011).

Figura 2. Interação entre O-GlcNAc e fosforilação de proteínas. Ambas ocorrem em resíduos de serina (Ser) e treonina (Tre) e representam processos dinâmicos. Em algumas proteínas, há uma competição entre O-GlcNAc e fosforilação, onde ambas competem pelo mesmo sítio; outras proteínas podem ser concomitantemente fosforiladas e glicosiladas em sítios distantes; ou ainda, estes dois processos podem ocorrer em sítios adjacentes. Além disso, estas modificações influenciam uma a outra, por regularem a atividade ou a localização das enzimas envolvidas nos dois ciclos. Esta complexa e extensa interação entre estes dois processos interfere em sítios que regulam as funções das proteínas e a sinalização de eventos. OGT, O-GlcNAc transferase; OGA, O-GlcNAcase; Tir, tirosina. **Fonte:** Victor V. Lima, Kathryn Spitler, Hyehun Choi, R. Clinton Webb and Rita C. Tostes. O-GlcNAcylation and oxidation of proteins: is signalling in the cardiovascular system becoming sweeter?. *Clinical Science*, V.123, 2012 (In press).

1.1.2 - O-GlcNAc vs. doenças cardiovasculares

Níveis elevados de O-GlcNAc contribuem para a etiologia de doenças que acometem uma grande parcela da humanidade, particularmente o diabetes. O aumento da O-GlcNAc no substrato para receptores de insulina (IRS) reduz a interação destes com a enzima fosfoinosítídeo 3-cinase (PI3K), bloqueando assim a via de sinalização da insulina (VOSSELLER *et al.*, 2002; FEDERICI *et al.*, 2002).

Camundongos transgênicos que hiperexpressam GFAT na musculatura esquelética e tecido adiposo desenvolveram resistência à insulina e hiperleptinemia (COOKSEY *et al.*, 2002; HEBERT *et al.*, 1996). A infusão de glucosamina, *in vivo*,

também resulta em resistência à insulina no músculo esquelético (VIRKAMAKI *et al.*, 1997; VIRKAMAKI *et al.*, 1999; PATTI *et al.*, 1999). Além disso, alguns estudos demonstram que a hiperglicemia, hiperlipidemia e hiperinsulinemia levam ao aumento da produção de O-GlcNAc, interferindo em diversas vias de sinalização, transcrição e outras funções celulares (MARSHALL *et al.*, 1991; MCCLAIN *et al.*, 2002; PARKER *et al.*, 2004). Existe uma correlação positiva entre os polimorfismos no gene da OGA e o diabetes tipo 2 (LEHMAN *et al.*, 2005). O aumento da O-GlcNAc também está associado à disfunção de cardiomiócitos, geralmente observada em modelos animais de doenças metabólicas (FULOP *et al.*, 2007). Alterações nos mecanismos de excitação-contração do miocárdio, ou mais especificamente, diminuição do relaxamento e atividade da Ca^{2+} -ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA), em função do aumento da O-GlcNAc, foram descritas em cardiomiócitos de animais diabéticos, assim como em cardiomiócitos normais incubados com glucosamina ou meio hiperglicêmico (REN *et al.*, 1997; DAVIDOFF *et al.*, 1997; DUTTA *et al.*, 2002; REN *et al.*, 1997). Além disso, a indução de diabetes em camundongos, pela administração de estreptozotocina, causa o aumento da expressão de OGT cardíaca e dos níveis de proteínas O-GlcNAc, eventos que são acompanhados por disfunção dos cardiomiócitos (Y. HU *et al.*, 2005). Uma correlação entre o aumento dos níveis de O-GlcNAc e a disfunção cardíaca foi demonstrada em um estudo, onde utilizou-se cardiomiócitos neonatais. Nestas células, o aumento da expressão de OGT prolonga a saída de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático, enquanto a hiperexpressão de OGA reduz a saída de Ca^{+2} e diminui a expressão gênica e proteica da SERCA (CLARK *et al.*, 2003). O aumento dos níveis de O-GlcNAc, em resposta à hiperglicemia ou ao tratamento com glucosamina, também está associado com a ativação do fator de transcrição p53, diminuição do crescimento celular, aumento da síntese de angiotensina II e aumento de apoptose. Todos estes eventos estão relacionados ao início rápido da falência cardíaca após o infarto do miocárdio em pacientes diabéticos (FULOP *et al.*, 2007).

Proteínas com importante papel na função vascular também são alvo da O-GlcNAc. Exemplos incluem a eNOS, SERCA, fosfolipase C (PLC), PKC, PI3K e proteínas envolvidas na regulação do citoesqueleto e organização de microtúbulos (HART *et al.*, 2007; ZACHARA *et al.*, 2006; CHEUNG *et al.*, 2008). Embora seja claro que a O-GlcNAc desempenhe um papel crítico na regulação da função dessas proteínas, pouco se sabe sobre os impactos do aumento dos níveis de O-GlcNAc na

função vascular. Evidências do nosso laboratório sugerem que o tratamento com inibidor seletivo da OGA (PUGNAc - 10^{-4} mol/L, por 24h) aumenta o conteúdo de proteínas O-GlcNAc, assim como promove aumento da reatividade vascular para estímulos contráteis (fenilefrina e serotonina) (LIMA *et al.*, 2008). Além disso, foi demonstrada uma relação positiva entre a disfunção vascular presente na hipertensão e a O-GlcNAc. Os níveis de proteínas O-GlcNAc, bem como a reatividade vascular estão significativamente aumentados tanto em artérias de resistência (mesentérica) como de condutância (aorta) de ratos hipertensos DOCA-sal, um modelo de hipertensão experimental induzido pelo excesso de mineralocorticóide, (LIMA *et al.*, 2009) e de ratos com hipertensão induzida por angiotensina II e sal (RIGSBY *et al.*, 2009). A incubação das artérias com PUGNAc resulta no aumento dos níveis de O-GlcNAc e concomitante aumento da reatividade a estímulos contráteis em artérias de ratos normotensos, mas não em ratos hipertensos (LIMA *et al.*, 2008; LIMA *et al.*, 2009). Esses dados indicam que o aumento da O-GlcNAc pode também contribuir para a hiper-reatividade vascular associada à hipertensão.

Recentes estudos demonstram que o aumento da O-GlcNAc também interfere com muitos aspectos do processo inflamatório. Por exemplo, células mesangiais de ratos que apresentam aumento de fluxo na via VBH exibem aumento da atividade do fator nuclear kappa B (NF- κ B) e aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias que podem contribuir para glomeruloesclerose (JAMES *et al.*, 2002). O aumento dos níveis de O-GlcNAc em leucócitos e neutrófilos humanos, induzido pela administração de glucosamina ou PUGNAc, aumenta a quimiotaxia induzida por agonistas como também estimula a quimiotaxia na ausência de qualquer estímulo (KNEASS *et al.*, 2004).

Em contraste, o aumento dos níveis de O-GlcNAc também está associado com atividade anti-inflamatória, bem como ao aumento da tolerância ao estresse. Xing e colaboradores demonstraram que proteínas modificadas pela O-GlcNAc podem inibir o processo inflamatório agudo e a resposta neointimal frente a uma lesão arterial endoluminal, sugerindo que o O-GlcNAc pode apresentar efeitos cardioprotetores e anti-inflamatório nas artérias submetidas à lesão endoluminal aguda (XING *et al.*, 2008). Estas observações corroboram com outros estudos, onde a inibição aguda da formação de O-GlcNAc diminui a sobrevivência dos cardiomiócitos, em condições de estresse agudo do miocárdio (LACZY *et al.*, 2009; CHATHAM *et al.*, 2008; NGOH *et al.*, 2010; JONES

et al., 2008; S. YANG *et al.*, 2006). Um desses trabalhos evidenciou que a administração de glucosamina, durante a ressuscitação de um modelo de ratos com trauma-hemorragico, aumenta os níveis teciduais de O-GlcNAc, melhorando a função cardíaca e reduzindo níveis circulantes de citocinas como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-6 (IL-6) e molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1). Já em culturas primárias de cardiomiócitos, tanto a administração de glucosamina como a hiper-expressão de OGT, ambas resultando no aumento dos níveis de O-GlcNAc, reduziram a expressão de fatores inflamatórios (NF- κ B) induzida por lipopolissacarídeo (ZOU *et al.*, 2009). Interessantemente, o tratamento com PUGNAc atenua o dano tecidual subsequente, bem como respostas associadas ao processo inflamatório após o choque hipovolêmico (NOT *et al.*, 2010). Juntos, estes estudos demonstram que o estresse leva ao aumento transiente dos níveis de O-GlcNAc, sendo que este fenômeno está associado com o aumento da tolerância ao estresse (ZACHARA *et al.*, 2006; ZACHARA *et al.*, 2004; ZACHARA *et al.*, 2004).

A deleção da OGT em tecidos-alvo demonstra que células de mamíferos necessitam de um alelo *Ogt* funcional para desenvolvimento normal, indicando que a O-GlcNAc modula a expressão, bem como atividade, de proteínas essenciais à viabilidade celular (O'DONNELL *et al.*, 2004; SHAFI *et al.*, 2000). Além disso, uma das primeiras respostas ao estresse celular é um aumento rápido e global de O-GlcNAc (ZACHARA *et al.*, 2004). Experimentalmente, a diminuição de OGT, como também dos níveis de O-GlcNAc, resulta em menor tolerância ao estresse, sugerindo que a O-GlcNAc representa importante mecanismo para sobrevivência celular (ZACHARA *et al.*, 2004).

Considerando que a modulação através da O-GlcNAc revelou-se de grande importância na regulação da função cardiovascular, faz-se necessário uma melhor compreensão de como essa modificação regula a função, especificamente, da vasculatura. Como poucos estudos avaliaram o impacto do aumento dos níveis de O-GlcNAc na função vascular e considerando nossos resultados obtidos em experimentos realizados com o modelo de hipertensão DOCA-sal (LIMA *et al.*, 2009), decidimos avaliar uma via de sinalização que se encontra alterada nesse modelo, e que contribui para a disfunção vascular observada nesse modelo experimental de hipertensão sal-sensível. Sendo assim, uma breve revisão sobre aspectos clássicos do sistema ET-1 e do sistema RhoA/Rho cinase serão abordados a seguir.

1.2 - Sistema Endotelina

Descoberta há 24 anos, por Yanagisawa e colaboradores (YANAGISAWA *et al.*, 1988), a endotelina desempenha um papel crucial na função vascular da maioria dos órgãos, incluindo o pulmão, rins, coração e cérebro, tanto em condições fisiológicas como em condições patológicas. Constituída por 21 resíduos de aminoácidos, este peptídeo é encontrado no homem em três isoformas: endotelina (ET)-1, ET-2 e ET-3 (Figura 3). Uma quarta isoforma (ET-4) foi relatada em ratos e camundongos como um análogo da ET-2 humana.

Predominante no sistema cardiovascular, a isoforma ET-1 é derivada de uma proteína de 212 resíduos de aminoácidos denominada pré-pró-ET-1. A pré-pró-ET-1 sofre clivagem proteolítica, através da ação de endopeptidase, gerando uma forma intermediária, conhecida como pró-ET-1 ou big ET-1, contendo 38 resíduos de aminoácidos. A enzima conversora de endotelina-1 (ECE1), por sua vez, cliva a pró-ET-1 a uma proteína de 21 resíduos de aminoácidos, denominada ET-1, a qual é biologicamente 100 vezes mais potente que a pró-ET-1 (YANAGISAWA *et al.*, 1988; INOUE *et al.*, 1989). Um processo similar converte a pré-pró-ET-2 e a pré-pró-ET-3 nas suas respectivas formas ativas.

Figura 3. Estrutura das endotelinas. Em destaque, as endotelinas ET-2 e ET-3 que diferem da ET-1 pela presença de dois e seis aminoácidos, respectivamente. Asp=ácido aspártico, Cis=cisteína, Glu=ácido glutâmico, His=histidina, Iso=isoleucina, Leu=leucina, Lis=lisina, Met=metionina, Fen=fenilalanina, Ser=serina, Tre=treonina, Trp=triptofano, Tir=tirosina, Val=valina. **Fonte:** Ernesto L. Schiffrin. Vascular endothelin in hypertension. **Vascular Pharmacology**, V.43, p. 19– 29, 2005.

A ET-1 é produzida principalmente pelas células endoteliais e pelas células do músculo liso vascular, como também por astrócitos e neurônios no sistema nervoso central, células endometriais, células epiteliais, células de Sertoli, células mensangiais e hepatócitos (LEVIN 1995; GORACA 2002). Normalmente, os níveis circulantes de endotelina, bem como a produção deste peptídeo em vasos sanguíneos isolados, são relativamente baixos, sugerindo que em condições fisiológicas, pouca endotelina é produzida devido à ausência de estímulos e/ou à presença de mecanismos inibitórios (Z. H. YANG *et al.*, 1989).

Vários fatores agem estimulando a produção e a liberação de endotelina, incluindo a estimulação mecânica do endotélio, trombina, íons cálcio, epinefrina, angiotensina II, vasopressina, dopamina, eritropoetina, citocinas, fatores de crescimento, endotoxinas e situações de estresse (LEVIN 1995; GORACA 2002; DAVENPORT *et al.*, 2006).

Com meia-vida plasmática de 1 minuto, a ET-1 é removida da circulação tanto por mecanismos mediados por receptores como por enzimas (GASIC *et al.*, 1992). Os receptores ET_B têm um papel importante no clearance da ET-1 circulante. A ligação da ET-1 a seu receptor ET_B induz internalização do complexo ligante-receptor, iniciando a degradação intracelular que representa a maior parte do clearance da ET-1, particularmente na circulação pulmonar (DUPUIS *et al.*, 1996). Apesar da ET-1 ter meia-vida curta, este peptídeo tem efeitos tanto de curto como de longo prazo na vasculatura, incluindo contração, crescimento celular, proliferação, diferenciação, inflamação e geração de estresse oxidativo (GIACHINI *et al.*, 2008).

Os efeitos biológicos das endotelinas são mediados pela ativação de dois receptores específicos: ET_A e ET_B. Enquanto a ET-1 e ET-2 ligam-se tanto a receptores ET_A como ET_B com afinidade semelhante, a ET-3 tem maior afinidade aos receptores ET_B. Descrito em serpentes, um terceiro receptor denominado ET_C exibe alta afinidade pela ET-3, porém homólogo para esse receptor ainda não foi identificado nos tecidos de mamíferos (DAVENPORT *et al.*, 2006; ARAI *et al.*, 1990; DAVENPORT 2002; SAKURAI *et al.*, 1990). Os receptores de endotelina tem ampla distribuição nos tecidos e são expressos na vasculatura, rins, coração, cérebro, fígado, pulmões e pele reforçando a importância biológica deste sistema. Dentro da vasculatura, os receptores ET_A e ET_B são responsáveis pelos efeitos vasoconstritores da ET-1 (HAYNES *et al.*, 1993). Nas paredes dos vasos

sanguíneos, os receptores ET_A são expressos principalmente por células musculares lisas, enquanto que o receptor ET_B é expresso tanto por células endoteliais como por células musculares lisas. Quando os receptores ET_A são ativados, promovem vasoconstrição. Já os receptores ET_B foram, inicialmente, subdivididos em ET_{B1} e ET_{B2} . Alguns autores acreditavam que o receptor ET_{B1} , presentes no endotélio, promovia vasodilatação pela estimulação da produção de óxido nítrico enquanto que o receptor ET_{B2} , expresso também nas células musculares lisas, promoveria vasoconstrição (DAVENPORT *et al.*, 1993; VERHAAR *et al.*, 1998). Porém esta subdivisão dos receptores ET_B é considerada controversa pois não foi demonstrado nenhuma mudança na sequência de aminoácidos entre estes receptores.

Inúmeros estudos demonstraram, em diversas espécies de animais, que a administração exógena de ET-1 induz uma resposta vascular bifásica que se inicia por uma rápida e transitória redução da pressão arterial, seguida de um aumento prolongado. Associada a ativação dos receptores ET_B , presente no endotélio, a resposta depressora resulta da liberação de prostaciclina e óxido nítrico do endotélio vascular, enquanto que a resposta pressora decorre da constrição direta do músculo liso vascular, associado a ativação dos receptores ET_A e ET_B (GIACHINI *et al.*, 2008). Desta forma, o efeito global da ET-1 no tônus vascular é um resultado do equilíbrio entre o efeito vasoconstritor direto via receptores ET_A e ET_B , presentes nas células no músculo liso, e o efeito vasodilatador via receptores ET_B , no endotélio.

Os receptores ET_A são funcionalmente acoplados à proteína $G_{q/11}$, a qual ativa a PLC, e à proteína inibitória G, que promove a inibição da adenilato ciclase, diminuindo a produção de monofosfato cíclico de adenosina (AMPC) (ROBIN *et al.*, 2002). Em CMLV, a interação entre a ET-1 e os receptores ET_A induz mudança conformacional no receptor, fazendo com que o trifosfato de guanosina (GTP) se ligue ao receptor associado à subunidade α da proteína $G_{q/11}$. A ativação da proteína $G_{q/11}$ α resulta na dissociação do complexo $\beta\gamma$, dando início a cascata de sinalização da proteína G. Os receptores ET_A acoplados à proteína G estimulam a PLC e esta, por sua vez, hidrolisa fosfatidil-inositóis da membrana celular, liberando trifosfato de inositol (IP3) e diacilglicerol (DAG) (NEYLON 1999). IP3 e DAG promovem elevação dos níveis intracelulares de cálcio e ativação da PKC (ROBIN *et al.*, 2002; IVEY *et al.*, 2008). A ET-1 também ativa canais de cálcio dependentes de voltagem, aumentando o influxo de cálcio. Esses dois principais mecanismos de ação da

endotelina estão estreitamente inter-relacionados. O cálcio, ligado à calmodulina, ativa a miosina cinase de cadeia leve, que contribui para a fosforilação das miosinas, induzindo a contração da musculatura lisa vascular (SMITH *et al.*, 2003; CHEW *et al.*, 2003).

As alterações fisio(pato)lógicas observadas com manipulações da expressão deste peptídeo estabelecem uma associação da ET-1 com várias doenças, incluindo hipertensão, acidente vascular cerebral, insuficiência renal, diabetes, inflamação, fibrose, esclerodermia, disfunção sexual e glaucoma. Por isso, os antagonistas dos receptores de ET-1 (AREs) e os inibidores da ECE1 foram rapidamente desenvolvidos a fim de prevenir ou atenuar importantes sinais e sintomas de patologias relacionadas a elevados níveis de ET-1, em vários modelos experimentais. Posteriormente, numerosos estudos clínicos e testes bem sucedidos resultaram na aprovação, pela FDA (Food and Drug Administration) e pela ANVISA, do uso de ERAs seletivos e não seletivos no tratamento terapêutico da hipertensão pulmonar e, mais recentemente, no tratamento das úlceras digitais desenvolvidas em pacientes com esclerodermia (LIMA *et al.*, 2011). Grande atenção tem sido dirigida para as vias de sinalização ativadas pela interação da ET-1 com seus receptores, como por exemplo, a via da RhoA/Rho cinase. Frente a esta realidade, novas terapias no tratamento da disfunção vascular, associada à múltiplas doenças, podem surgir a partir de abordagens investigativas.

1.3 - Via de sinalização da RhoA/Rho cinase

Vários estudos têm demonstrado o papel da via RhoA/Rho cinase em numerosas respostas celulares, incluindo a contração das CMLV. A ativação desta via de sensibilização ao cálcio é regulada pelo estado de ligação da RhoA (SOMLYO *et al.*, 2000). Assim como outras proteínas, a RhoA é ativada pela ligação do GTP. No estado inativo, a RhoA é primariamente citosólica e está ligada ao difosfato de guanosina (GDP) e ao inibidor da dissociação de guanina (GDI), o que estabiliza o GDP ligado. A ligação do GTP e, conseqüentemente, a ativação da RhoA é facilitada pelos fatores de troca GTP/GDP (Rho GEFs), os quais são identificado em células do músculo liso, como: PDZ-Rho GEF, LARG e p115-RhoGEF (NUNES *et al.*, 2010; SOMLYO *et al.*, 2000).

Quando ativada, a via RhoA/Rho cinase favorece a contração muscular através da inibição da miosina fosfatase. Isso ocorre, pois o processo de contração do músculo liso vascular é regulado, principalmente, pela fosforilação da miosina de cadeia leve (MLC), ativada pela Ca^{2+} -calmodulina, possibilitando a interação molecular da actina com a miosina (UEHATA *et al.*, 1997; HILGERS *et al.*, 2005). Este estado de fosforilação da MLC é regulado pela miosina fosfatase, uma enzima que remove o fosfato da MLC, promovendo o relaxamento da musculatura lisa. A miosina fosfatase, quando isolada do músculo liso, é composta por três subunidades: uma pequena subunidade não catalítica de função desconhecida (HILGERS *et al.*, 2005; HARTSHORNE *et al.*, 1998), uma subunidade catalítica da fosfatase 1 (PP1c) e uma subunidade regulatória da miosina fosfatase (MYPT-1). A inibição da MYPT-1, promovida pela RhoA é indicada pela fosforilação no resíduo Tre^{853} , diminui a atividade enzimática da miosina fosfatase, permitindo que a MLC permaneça fosforilada e, conseqüentemente, sustente a contração (HILGERS *et al.*, 2005). Além disso, a proteína inibitória da subunidade catalítica da miosina fosfatase (CPI-17), quando fosforilada, é capaz de se ligar à MYPT-1 inibindo a atividade da enzima, prolongando assim a contração do músculo liso.

A ET-1 é um exemplo de agonista capaz de ativar a via RhoA/Rho cinase em CMLV, resultando na contração (GOHLA *et al.*, 2000). Os receptores de ET-1 são acoplados à proteína G_{α} , a qual é capaz de ativar a via RhoA/Rho cinase através da ativação de Rho GEFs. Outros agonistas, tais como fenilefrina, serotonina, prostaglandina $\text{F2}\alpha$ e histamina também são capazes de promover vasoconstrição mediada pela via RhoA/Rho cinase.

O aumento de atividade da via RhoA/Rho cinase contribui para a hipereatividade vascular associada a hipertensão (CHITALEY *et al.*, 2001). Inibidores da Rho cinase, tais como Y-27632 ou fasudil, normalizam a pressão arterial em modelos experimentais de hipertensão (UEHATA *et al.*, 1997). Além disso, o bloqueio prolongado da Rho cinase suprime a formação de lesões vasculares, como hipertrofia e fibrose vascular (MUKAI 2002). Podemos dizer que tanto a disfunção vascular como o aumento da atividade da via RhoA/Rho cinase são bem estabelecidos em vários modelos de hipertensão sensível ao sal, onde incluímos a hipertensão DOCA-sal (SEKO *et al.*, 2003; CALLERA *et al.*, 2003; WEHRWEIN *et al.*, 2004).

Dados do nosso laboratório revelam que o aumento vascular de proteínas O-GlcNAc acarreta aumento na resposta vascular a estímulos constritores (LIMA *et al.*, 2008). Além disso, resultados demonstram que o conteúdo vascular de proteínas O-GlcNAc está aumentado em artérias de ratos DOCA-sal (LIMA VV *et al.*, 2009; LIMA *et al.*, 2009). Considerando que a ET-1 contribui para a disfunção vascular em artérias de ratos DOCA-sal e que proteínas com importante papel na função vascular são alvos de O-GlcNAc durante a hipertensão dependente de mineralocorticoide, decidimos investigar a possível associação entre proteínas O-GlcNAc e ET-1 na gênese da disfunção vascular.

2 – OBJETIVO GERAL

O presente estudo testa a hipótese geral de que o aumento da resposta vascular contrátil induzido pela ET-1 é resultado da hiperativação da via RhoA/Rho cinase, que por sua vez é mediada pelo aumento dos níveis de proteínas O-GlcNAc.

2.1 - Objetivos específicos

(Parte: 01) - Avaliar o efeito da ET-1 nos níveis vasculares de proteínas O-GlcNAc, tanto *in vitro* como *in vivo*.

- ✓ Avaliar se a ET-1 altera os níveis vasculares de proteínas O-GlcNAc e a expressão das enzimas OGT e OGA.
- ✓ Avaliar se as alterações vasculares induzidas pela ET-1 são modificadas na presença de inibidores da via O-GlcNAc.
- ✓ Avaliar se a ET-1 é elemento fundamental para o aumento dos níveis vasculares de proteínas O-GlcNAc na hipertensão dependente de mineralocorticoide.

(Parte: 02) - Verificar se a O-GlcNAc contribui para os efeitos vasculares da ET-1, através da ativação da via RhoA/Rho cinase em células do músculo liso vascular (CMLV).

- ✓ Avaliar o efeito vascular da ET-1 na presença de inibidor da Rho cinase.
- ✓ Avaliar o efeito da ET-1 na expressão das enzimas envolvidas na via da RhoA/Rho cinase em CMLV, tratadas ou não com antagonista de receptores ET_A, ou com inibidor da OGT, ou em células transfectadas com siRNA de interferência para OGT.

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Animais. Foram utilizados ratos Wistar de 8 a 10 semanas de idade com massa corporal entre 230 a 250 gramas, provenientes dos Laboratórios Harlan (Indianápolis, IN – EUA). Todos os procedimentos estão em acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciências de Animais de Laboratório e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (007/04/CEUA). Além disso, os procedimentos realizados neste estudo também seguiram as normas do guia de princípios adotados para a experimentação animal, aprovado pelo Comitê de Uso de Animais para a Pesquisa e Educação (AUP# 09-01-152) do Georgia Health Sciences University. Os animais tiveram livre acesso à água e ração e foram mantidos em sala com temperatura e umidade constantes (24°C – 60%) e com ciclos claro/escuro (12/12 horas).

3.2 - Indução da hipertensão DOCA-Sal. Os ratos, com 8 semanas de idade, foram anestesiados com mistura de isoflurano (5%) em O₂ (100%) por via nasal. Após incisão dorso-lateral, foi realizada a remoção do rim esquerdo. Após a cirurgia, pellets com acetato de desoxicorticosterona (DOCA – 200mg/Kg de rato) foram implantados no dorso dos ratos uninefrectomizados (UNI) seguido pelo tratamento com água contendo 1% de cloreto de sódio e 0,2% de cloreto de potássio, durante 5 semanas. Alguns animais receberam, adicionalmente, antagonista de receptores ET_A (atrasentan - 5 mg/kg/dia, por via oral) ou veículo (H₂O). Após 5 semanas de tratamento, aortas de ratos DOCA-sal, tratados com atrasentan ou veículo, e ratos controle (UNI com acesso à água) foram removidas para avaliar a função vascular ou expressão da proteína.

3.3 - Infusão de baixas doses de ET-1. Os ratos, com 10 semanas de idade, foram anestesiados com mistura de isoflurano (5%) em O₂ (100%) por via nasal. Minibombas osmóticas (ALZET Osmotic Pumps, CA) com ET-1 (2 pmol/kg por minuto; Phoenix Pharmaceuticals) ou cloreto de sódio (0,9%) foram mantidas a 37°C, em solução fisiológica, por 12 horas. As mibombas foram então acopladas a

um catéter implantado na veia jugular, por 14 dias. Segmentos da aorta dos animais infundidos com ET-1 ou cloreto de sódio foram removidos para a realização de estudos funcionais e moleculares.

3.4 - Medida de pressão arterial. A pressão arterial caudal foi determinada por método indireto em ratos acordados, pela técnica de pletismografia de cauda. Dois dias antes da primeira medida de pressão arterial caudal, os ratos foram submetidos a período de adaptação que envolvia o aquecimento dos animais em uma caixa mantida a 37°C por 10 minutos e a contenção em cilindro de acrílico com abertura para o focinho e cauda, por 5 minutos. Este procedimento foi realizado uma vez ao dia, durante dois dias. Após o procedimento de adaptação, os níveis pressóricos dos ratos foram determinados através de oclusor, o qual foi ajustado à porção proximal da cauda e acoplado a transdutor pneumático caudal elétrico PE-399 conectado a sistema de transdução (RTBP 1001 Kent Scientific Corporation, Litchfield, Conn., EUA). O valor final da pressão arterial caudal de cada animal representa a média aritmética de três medidas sequenciais.

3.5 - Reatividade vascular. Após serem removidas, as artérias de condutância (aorta torácica) foram cortadas no sentido transversal em segmentos de 4 mm de comprimento. Em algumas preparações o endotélio foi mecanicamente removido com haste metálica. Em seguida, os segmentos aórticos foram montados em cubas para medidas de tensão isométrica, através de sistema de aquisição de dados (PowerLab/8S, ADInstruments Pty Ltd., Austrália). As preparações foram continuamente lavadas com solução de Krebs com a seguinte composição: NaCl 130 mmol/L, KCl 4,7 mmol/L, KH₂PO₄ 1,18 mmol/L, MgSO₄.7H₂O 1,17 mmol/L, NaHCO₃ 14,9 mmol/L, EDTA 0,026 mmol/L, CaCl₂.2H₂O 1,6 mmol/L, D-glicose 5,55 mmol/L; e gaseificadas com carbogênio (95% O₂ e 5% CO₂). Cada segmento vascular foi submetido à tensão basal (30mN), durante período de estabilização de 60 minutos. Para verificar a integridade dos vasos, depois de finalizado o período de estabilização, estes foram estimulados com cloreto de potássio (KCl, 120 mmol/L) durante 15 minutos. Após este período, cada preparação foi lavada com Krebs em intervalos de 10 minutos, durante período de 30 minutos. A eficácia da remoção do endotélio foi avaliada em protocolo onde os segmentos de aortas foram contraídos com fenilefrina

(PE, 1 $\mu\text{mol/L}$) e posteriormente estimulados com acetilcolina (10 $\mu\text{mol/L}$). A completa remoção do endotélio foi caracterizada pela ausência de resposta de relaxamento após a estimulação com acetilcolina, a qual induz vasodilatação dependente do endotélio. Em seguida, foi realizada curva concentração-resposta para fenilefrina (PE – 1 nmol/L a 100 $\mu\text{mol/L}$) e/ou serotonina (5-HT – 1 nmol/L a 100 $\mu\text{mol/L}$). Os protocolos foram realizados em aortas incubadas com PUGNAc [O-(2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranosylidene) amino- N-phenylcarbamate; 100 $\mu\text{mol/L}$, Toronto Research Chemicals, Canada] vs. veículo (metanol, 24 horas) ou ET-1 (0,1 $\mu\text{mol/L}$) vs. veículo (H_2O , 24 horas) ou com aortas de ratos DOCA-sal, tratados com atrasentan ou veículo e do seu respectivo controle (UNI). Em alguns experimentos, aortas torácicas foram pré-incubadas (3h) com o inibidor da OGT [ST045849; 3-(2-adamantanylethyl)-2-[(4-chlorophenyl)azamethylene]-4-oxo-1,3-thiazaperhydrazone-6-carboxylic acid; 100 $\mu\text{mol/L}$], antagonista ET_A (atrasentan, 1 $\mu\text{mol/L}$); inibidor da Rho cinase (Y-27632, 1 $\mu\text{mol/L}$; Tocris Bioscience, EUA) ou com seus respectivos veículos [Dimetilsulfóxido (DMSO) ou H_2O], por 40 minutos.

3.6 - Inibição da cascata de sinalização intracelular utilizando anticorpos em segmentos vasculares isolados. Um trabalho recente, realizado por Clarke e colaboradores (CLARKE *et al.*, 2008), demonstrou que anticorpos podem servir como inibidores específicos de componentes da cascata de sinalização em CMLV de segmentos vasculares isolados. Um anticorpo contra a enzima O-GlcNAc transferase (OGT - Santa Cruz Biotechnology, CA) foi internalizado através da técnica de *Chariot* (*Chariot*[™] Protein Delivery Reagent, Active Motif, Carlsbad, CA). Este reagente de transfecção é capaz de internalizar anticorpos nas células, preservando sua habilidade de localizar os compartimentos celulares e reconhecer antígenos dentro da célula. O *Chariot* também é utilizado para internalizar proteínas no tecido vascular (GIACHINI *et al.*, 2009) e durante nossos experimentos foi utilizado para inibir diretamente a OGT.

O complexo *chariot*/anticorpo foi preparado de acordo com as instruções do fabricante, utilizando o DMSO como veículo. Após a incubação, os segmentos vasculares foram montados em miógrafos para realização de estudos funcionais, conforme previamente descrito no item 3.5.

3.7 - Cultivo de células de músculo liso vascular. Segmentos da aorta torácica de ratos Wistar, após a retirada da camada endotelial por atrito mecânico, foram colocados em placas de cultura de poços contendo Meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino e 0,5% de penicilina e estreptomicina em estufa umidificada a 37°C com 95% de CO₂. As células foram mantidas na placa até a confluência de aproximadamente 80% e os repiques foram realizados por exportação em solução de 0,05% de tripsina por 5 minutos e manutenção da cultura em placas de cultura em discos de 100x20mm até a quarta passagem. Ensaios imuno-histoquímicos foram utilizados para caracterizar as CMLVs e para confirmar a ausência de outros tipos de células nas culturas. As células expressaram α -actina de músculo liso e calponina, proteínas contráteis, que são indicativas de CMLV. Nenhuma imunorreatividade positiva para o fator de von Willebrand VIII ou CD31 (molécula de adesão de plaquetas célula endotelial-1), marcadores de células endoteliais, foi detectada (dados não mostrados). Os protocolos foram realizados na ausência e na presença de ET-1 (0,1 nmol/L a 1 μ mol/L) ou veículo (H₂O), por 5 minutos, 1, 3, 6, 12 ou 24h. Em alguns experimentos, as CMLVs foram pré-incubadas (3h) com o inibidor da OGT (ST045849, 100 μ mol/L; TimTec LLC) ou com o antagonista de receptores ET_A (atrasentan, 1 μ mol/L); ou transfectadas com siRNA de interferência para OGT (100 nmol/L, como descrito a baixo).

3.8 - Transfecção com RNA de interferência. O siRNA (On-Target *plus* SMART pool; 100 nmol/L) para OGT, assim como o controle negativo da siRNA, foram (Dharmacon, EUA) incubados com Lipofectamine 2000 (Invitrogen) em 1,0 mL de DMEM por 30 minutos. Este “SMART pool” corresponde a uma mistura de quatro siRNA para OGT, em uma única solução. As CMLV foram incubadas com o complexo siRNA-Lipofectamine 2000 e 4,0mL de DMEM sem soro fetal bovino, por 2 dias. No terceiro dia as células foram incubadas com ET-1 (0,1 μ mol/L) ou veículo (H₂O), por 24h.

3.9 - Western blotting. Proteínas (60ug) extraídas da aorta torácica com endotélio ou CMLV foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (10%) e transferidas para membrana de nitrocelulose. Sítios de ligação inespecíficos foram

bloqueados com leite desnatado (5%), diluído em tampão Tris-salina (TBS-T) contendo Tris (10 mmol/L), Tween 20 (0,02%) e NaCl (150 mmol/L), por 1 hora. Nesta mesma solução, as membranas foram incubadas com anticorpos primários, overnight, a 4°C. Os anticorpos utilizados foram: anti-O-GlcNAc, formas totais da proteína CPI-17, MLC, MYPT-1, RhoA, fatores de troca de GTP/GDP (PDZ-Rho GEF e p115-Rho GEF), fator inibidor da dissociação de GDP (Rho GDI), Rho cinase β (ROCK- β) e Rho cinase α (ROCK- α). Imunoblot para formas fosforiladas foram realizados na mesma membrana usada para avaliar as formas não-fosforiladas: P-CPI-17 (Tre³⁸), P-MLC (Tre¹⁸/Ser¹⁹) e P-MYPT-1 (Tre⁸⁵³). Também foi avaliada a expressão proteica da OGT e OGA, com anticorpos gentilmente cedidos pelo Dr. Sidney Whiteheart da University of Kentucky. As diluições dos anticorpos utilizados neste estudo estão demonstradas na Tabela 1. Depois da incubação com anticorpos secundários, os sinais foram revelados pela exposição das membranas a solução de quimioiluminescência (SuperSignal West Pico Chemilumiscent Substrate, Pierce, EUA). As membranas foram então expostas por intervalos variados a um filme de Raio-X. Depois de reveladas, as bandas foram submetidas à análise densitométrica óptica utilizando do programa UN-SCAN-IT gel 6.1. Os resultados foram normalizados pela expressão proteica de β -actina ou pela forma não fosforilada da proteína.

Tabela 1: Lista de anticorpos primários e seus respectivos secundários.

Anticorpo primário (diluição)	Anticorpo secundário (diluição)	Companhia
O-GlcNAc (1:20000)	Camundongo (1:2000)	Pierce Biotechnology, EUA
Total CPI-17 (1:1000)	Coelho (1:2500)	Abcam Inc., EUA
P-CPI-17 (1:500)	Coelho (1:2000)	Abcam Inc., EUA
Total MLC (1:1000)	Coelho (1:1000)	Cell Signaling Technology, EUA
P- MLC (1:800)	Coelho (1:1000)	Cell Signaling Technology, EUA
Total MYPT-1 (1:500)	Coelho (1:2000)	Cell Signaling Technology, EUA
P- MYPT-1 (1:500)	Coelho (1:2000)	Cell Signaling Technology, EUA
RhoA (1:750)	Coelho (1:1000)	BD Biosciences, EUA
PDZ-Rho GEF (1:550)	Camundongo (1:2000)	Abcam Inc., EUA
p115-Rho GEF (1:500)	Camundongo (1:2000)	Abcam Inc., EUA
Rho GDI (1:1000)	Coelho (1:1000)	Cell Signaling Technology, EUA
ROCK- α (1:1000)	Camundongo (1:2500)	Cell Signaling Technology, EUA
ROCK- β (1:250)	Camundongo (1:2500)	Cell Signaling Technology, EUA
OGT (1:400)	Camundongo (1:1000)	Santa Cruz antibodies, EUA
OGA (1:1000)	Camundongo (1:4000)	Gentilmente cedido pelo Dr. Sidney Whiteheart

3.10 - Determinação da concentração sérica de glicose. Os ratos foram colocados em jejum por 12 horas, e as amostras de sangue foram coletadas da aorta abdominal. A concentração sérica de glicose foi determinada por fitas reativas, utilizando o glicosímetro digital Accu-Chek Active® (Roche).

3.11 - Atividade da RhoA. A atividade da RhoA foi determinada através da absorbância com base no kit de ensaio de atividade da RhoA G-LISA™ (Cytoskeleton, EUA; Cat # BK124). O kit RhoA G-LISA™ contém uma proteína ligante para Rho-GTP em todos os poços de uma placa de 96 poços. A porção ativa do GTP do lisado celular se fixa aos poços, através do ligante, enquanto que a parte inativa do GDP é removida durante as etapas de lavagem. A porção ativa da RhoA foi detectada por anticorpos específicos para RhoA, por absorbância. O nível de atividade da RhoA foi determinado através de leituras comparando os lisados celulares ativos versus amostras sem o lisado celular.

3.12 - Extração de RNA, síntese de cDNA, transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase em tempo real. O RNA total foi extraído dos segmentos da aorta torácica usando-se RNeasy comercial kit (Qiagen Sciences, MD, EUA). A quantidade, integridade e pureza das amostras de RNA foram determinadas pelo espectrofotômetro NanoDrop (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, EUA). Posteriormente, 1µg de RNA total foi utilizado para a transcrição reversa em um volume final de 50µL, usando-se o kit de alta capacidade de cDNA (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Em seguida, o produto do cDNA foi armazenado em temperatura de -20°C. Sondas para pré-pró-ET-1 (Nº Mn00438656_m1) mRNA foram obtidas da Applied Biosystems (Foster City, CA, EUA). A reação em cadeia da polimerase em tempo real foi realizada usando-se o sistema de PCR em tempo real rápido 7,500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) em volume total de 20µL seguindo-se o protocolo indicado pelo fabricante e usando-se o reagente TaqMan® para PCR universal rápido (2X) (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e 0,1 mM das sondas. Para verificar a especificidade das sondas, amostras controle negativas contendo água, ao invés de cDNA, foram utilizadas para todas as sondas utilizadas. Cada amostra foi normalizada com base no RNA ribossômico 18S. A quantificação de RNA ribossômico 18S foi realizada com o reagente de RNA

ribossômico TaqMan[®] (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), seguindo-se o protocolo indicado pelo fabricante. A expressão gênica relativa foi normalizada por um calibrador escolhido como sendo a condição basal (grupo controle) para cada ponto de tempo. Os resultados foram calculados pelo método $\Delta\Delta CT$ e expressos como vezes de mudança (*X-mudança*) na expressão gênica relativa ao RNA ribossômico 18S e ao calibrador da seguinte forma: $X-mudança = 2^{-(\Delta CT \text{ da amostra} - \Delta CT \text{ do calibrador})}$, onde o parâmetro CT (limiar) é definido como o número fracional de ciclos no qual o sinal detector da reação de PCR ultrapassa um limiar fixo. Os valores de ΔCT das amostras e do calibrador foram determinados subtraindo o valor médio de CT do transcrito sob investigação do valor médio de CT do gene 18S rRNA de cada amostra.

3.13 - 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-se o 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. A significância estatística dos dados foi determinada por meio do teste de variância (ANOVA *one way*) seguido do pós-teste de Newman-Keuls ou teste “*t*”. Os resultados do *western blot* foram normalizados pelo grupo controle e analisados pelo teste “*t*”-Student não pareado e o valor de P foi calculado pela razão “*t*” e pelos graus de liberdade. Valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4 – RESULTADOS (Parte 1)

4.1 - Avaliação do efeito da ET-1 nos níveis vasculares de proteínas O-GlcNAc *in vitro*

Na primeira parte do nosso estudo, testamos a hipótese de que o aumento da resposta vascular contrátil induzida pela ET-1 é mediado pelo aumento dos níveis de proteínas O-GlcNAc. Para avaliarmos essa hipótese, inicialmente, aortas torácicas com endotélio foram incubadas com veículo (H₂O, 24 horas) ou com ET-1 (0,1 µmol/L) por diferentes períodos (1, 3, 6, 12 ou 24 horas).

Observamos que a ET-1 produz aumento nos níveis vasculares globais de proteínas O-GlcNAc, de forma tempo-dependente (Figura 4). Porém, a estimulação com ET-1 resulta em uma correlação temporal inversa na expressão protéica da OGT e OGA (Figura 5), enzimas chaves no processo de O-GlcNAc. Conforme demonstrado na figura 5, observamos uma diminuição da expressão da OGT com 3, 6 e 12 horas de incubação com ET-1, retornando aos níveis basais em 24 horas de tratamento. Já a expressão da OGA diminuiu após 3 horas de incubação e assim permaneceu durante o tempo avaliado.

Figura 4. A incubação com ET-1 produziu aumento dos níveis vasculares de O-GlcNAc total, de forma tempo-dependente. Aortas torácicas com endotélio foram incubadas com ET-1 (0,1 μmol/L) ou veículo (H₂O), por 1, 3, 6, 12 ou 24 horas. *Western blots* foram realizados para avaliar os níveis vasculares de proteínas O-GlcNAc. Acima, imagens representativas de *western blot* e, abaixo, gráfico de barras demonstrando a expressão vascular de O-GlcNAc. Os valores foram normalizados pela expressão de β-actina, n=5 para cada experimento. * P< 0,05 vs. veículo (H₂O). A significância estatística dos dados foi determinada por meio do teste T-Student não pareado.

Figura 5. A incubação com ET-1 diminuiu a expressão protéica de OGT e OGA. Aortas foram incubadas com ET-1 (0,1 μ mol/L) ou veículo (H_2O), por 1, 3, 6, 12 ou 24 horas e *western blots* foram realizados para avaliar a expressão das enzimas OGT e OGA. Acima, imagens representativas de *western blot* e, abaixo, gráficos de barras demonstrando a expressão vascular de OGT ou OGA. Valores foram normalizados pela expressão de β -actina, n=5 para cada experimento. * P < 0,05 vs. veículo (H_2O). A significância estatística dos dados foi determinada por meio do teste T-Student não pareado.

Frente aos resultados obtidos e também com a finalidade de compararmos os efeitos vasculares da ET-1 com os efeitos do inibidor da OGA (PUGNAc), no aumento dos níveis de O-GlcNAc, decidimos utilizar a incubação por 24 horas nos estudos funcionais.

Após 24 horas de tratamento com ET-1, observamos aumento na reatividade vascular em aortas com endotélio estimuladas com fenilefrina (PE), um agonista α -1 adrenérgico, semelhante ao aumento na contração observado em aortas incubadas com PUGNAc (Tabela 2 e Figura 6A). Não houve diferenças na resposta máxima de contração induzida por KCl (120 mmol/L) entre os grupos ($E_{\max}$ [mN]: 22,6 $\pm$ 1,9 veículo; 22,8 $\pm$ 1,8 ET-1; e 21,67 $\pm$ 1,6 PUGNAc). Além disso, as diferenças na contração induzida pela PE, após a incubação com ET-1, foram mantidas em aortas sem endotélio ($E_{\max}$ [% do KCl]: 109,5 $\pm$ 2,3 veículo vs. 168,4 $\pm$ 11 ET-1).

A contração induzida por serotonina também encontra-se aumentada em aortas com endotélio incubadas com ET-1, quando comparada àquela em aortas incubadas com veículo [pD₂: 6,3 $\pm$ 0,1 veículo vs. 6,9 $\pm$ 0,1 ET-1; $E_{\max}$ [% do KCl]: 79 $\pm$ 7 veículos vs. 101 $\pm$ 1 ET-1; (n=5)], mostrando que a O-GlcNAc não interfere exclusivamente com as respostas contráteis mediadas por agonistas α -1 adrenérgicos (Figura 6B).

4.2 - Avaliação do efeito da ET-1 nos níveis vasculares de proteínas O-GlcNAc *in vivo*

Em nosso modelo *in vivo*, a infusão de ET-1 por 14 dias promoveu aumento na resposta contrátil da aorta à PE em comparação com aortas de animais controle (Tabela 2 e Figura 6C). Não foram observadas diferenças na resposta máxima de contração induzida por KCl entre os grupos [$E_{\max}$ (mN) 22,7 $\pm$ 2 controle vs. 25 $\pm$ 1 ET-1].

Além disso, a infusão de ET-1 por 14 dias em ratos Wistar promoveu o aumento dos níveis vasculares de proteínas O-GlcNAc (Figura 7A). Entretanto, a infusão de ET-1 por 14 dias não alterou a expressão protéica da OGT (Figura 7B), mas diminuiu a expressão da OGA (Figura 7C).

A pressão arterial (mmHg) foi semelhante entre os ratos controle e os tratados com ET-1 (117 $\pm$ 3 vs. 123 $\pm$ 4, n = 5, respectivamente, Tabela 3). A infusão de ET-1

não teve efeito sobre a glicemia de jejum [(mg/dL) $99,7 \pm 2$ controle vs. $102 \pm 7,4$ infusão de ET-1] ou sobre o ganho de peso corporal (Tabela 3).

Tabela 2: Valores de $E_{\max}$ e pD_2 para fenilefrina em aortas de ratos com endotélio incubadas com ET-1 ou provenientes de ratos infundidos com ET-1.

Fenilefrina		
Incubação (24horas)	$E_{\max}$ (%KCl 120mmol/L)	pD_2
Veículo	69 ± 6	$6,5 \pm 0,1$
PUGNAc	$115 \pm 5^*$	$6,7 \pm 0,06$
ET-1	$107 \pm 5^*$	$7,1 \pm 0,1^*$
Infusão (14 dias)		
Controle	77 ± 5	$7,4 \pm 0,06$
ET-1	$103 \pm 3^*$	$6,9 \pm 0,06^*$

Os resultados são apresentados como média $\pm$ EPM de cada grupo (n=6). Os valores experimentais de contração foram calculados em relação à resposta contrátil produzida pelo KCl (120 mmol/L), que foi considerada igual a 100%. * $P < 0,05$ vs. veículo (metanol) ou controle (cloreto de sódio). A significância estatística dos dados foi determinada por meio do teste de variância (ANOVA *one way*) seguido do pós-teste de Newman-Keuls ou teste “*t*”.

Figura 6. ET-1 e PUGNac aumentaram a resposta vascular contrátil. A incubação com ET-1 (0,1 $\mu\text{mol/L}$) ou PUGNac (100 $\mu\text{mol/L}$), por 24h, aumentou a contração vascular para **(A)** PE e 5-HT **(B)** em aortas torácicas com endotélio vs. veículo (metanol, $n=5$). A perfusão de ET-1 por 14 dias também aumentou contração induzida pela PE **(C)** ($n=5$). Valores experimentais de contração foram calculados em relação à resposta contrátil máxima por KCl (120 mmol/L) considerada como 100%. Os resultados são apresentados como média $\pm$ EPM de cada grupo experimental. * $p < 0,05$ vs. veículo (metanol) ou controle (infusão de cloreto de sódio). A significância estatística dos dados foi determinada por meio do teste de variância (ANOVA *one way*) seguido do pós-teste de Newman-Keuls ou teste “*t*”.

Figura 7. A perfusão de ET-1, durante 14 dias, aumentou os níveis de proteínas O-GlcNAc em aortas e diminuiu a expressão vascular da OGA. Aortas torácicas de ratos infundidos com ET-1 (0,1 nmol/L) ou cloreto de sódio (0,9%), por 14 dias, foram utilizadas para avaliar **(A)** os níveis vasculares de proteínas O-GlcNAc e a expressão das enzimas **(B)** OGT e **(C)** OGA, por *western blot*. Acima, imagens representativas de *western blot* e, abaixo, gráficos de barras demonstrando a expressão vascular de O-GlcNAc, OGT ou OGA. Valores foram normalizados pela expressão de β -actina, n=5 para cada experimento. * $P < 0,05$ vs. controle (cloreto de sódio). A significância estatística dos dados foi determinada por meio do teste T-Student não pareado.

Tabela 3: Pressão arterial sistólica, glicemia, peso corporal inicial e final dos ratos infundidos com ET-1 ou ratos DOCA-sal tratados com antagonista de receptores ET_A (atrasentan).

Parâmetros	Controle	ET-1 (14 dias)	Uni	DOCA-sal	DOCA-sal + atrasentan
PAS (mmHg)	117,5 ± 3	123,4 ± 4	124,9 ± 4	163,6 ± 6*	137,5 ± 6*
Glicemia (mg/dL)	99,7 ± 2	102 ± 7,4	103 ± 3,2	98,9 ± 7	107 ± 8
Peso inicial (g)	242 ± 4	238 ± 5	233 ± 7	243 ± 6	244 ± 5
Peso final (g)	385 ± 10	380 ± 9	391 ± 13	320 ± 7*	309 ± 12*

Pressão arterial sistólica (PAS). Os resultados são apresentados como média ± EPM de cada grupo experimental (n=6). * p <0,05 vs. Uni. A significância estatística dos dados foi determinada por meio do teste de variância (ANOVA *one way*) seguido do pós-teste de Newman-Keuls ou teste “t”.

4.3 - Avaliação do efeito da ET-1 na presença de inibidores da via O-GlcNAc

Após observarmos que a ET-1 é capaz de aumentar os níveis de O-GlcNAc vascular tanto *in vitro* como *in vivo*, decidimos avaliar se esse efeito era dependente da ativação da OGT.

A inibição seletiva da enzima OGT, através do composto ST045849 (100 $\mu\text{mol/L}$), resultou na diminuição dos níveis vasculares de proteínas O-GlcNAc (Figura 8A) e também atenuou os efeitos contráteis da ET-1 na reatividade vascular (Figura 8B), demonstrando que a OGT exerce importante efeito durante a estimulação com ET-1.

Além disso, a internalização de anticorpos contra a enzima OGT aboliu os efeitos da ET-1 nos níveis vasculares de proteínas O-GlcNAc, assim como na reatividade vascular (Figura 9A e 9B, respectivamente). A incubação com um anticorpo anti-IgG de coelho foi usado como um controle adicional e não foi capaz de normalizar os efeitos induzidos pela ET-1. Em conjunto, esses resultados indicam que o aumento vascular de O-GlcNAc, após estimulação com ET-1, ocorre por mecanismos dependentes da ativação de OGT.

Figura 8. Os efeitos da ET-1 (24 horas) foram atenuados pela inibição seletiva da enzima OGT.

A pré-incubação (3h) de aortas com o inibidor da OGT (ST045849, 100 $\mu\text{mol/L}$) resultou na diminuição dos **(A)** níveis vasculares de proteínas O-GlcNAc e também atenuou os efeitos da ET-1 (0,1 $\mu\text{mol/L}$, 24 horas) sobre a **(B)** reatividade vascular. **(A)** Acima, imagens representativas de *western blot* e, abaixo, gráfico de barras demonstrando a expressão vascular de O-GlcNAc. Valores foram normalizados pela expressão de β -actina, $n=5$ para cada experimento. **(B)** A curva concentração-resposta para PE representa a média $\pm$ EPM e os valores experimentais de contração foram calculados em relação à resposta contrátil produzida pelo KCl (120 mmol/L), considerada como 100%. * $P < 0,05$ vs. veículo (DMSO) A significância estatística dos dados foi determinada por meio do teste de variância (ANOVA *one way*) seguido do pós-teste de Newman-Keuls ou teste “*t*”.

Figura 9. A internalização de anticorpos contra a enzima OGT preveniu os efeitos da ET-1. Os efeitos da ET-1 nos **(A)** níveis vasculares de proteínas O-GlcNAc assim como na **(B)** reatividade vascular não foram observados quando os vasos foram previamente tratados com anticorpos neutralizantes para OGT, internalizados pela técnica de *chariot*. A incubação com um anticorpo anti-IgG de coelho foi usado como controle adicional e não preveniu os efeitos induzidos pela ET-1 [*Chariot* (IgG) + ET-1]. **(A)** Acima, imagens representativas de *western blot* e, abaixo, gráfico de barras demonstrando a expressão vascular de O-GlcNAc. Valores foram normalizados pela expressão de β -actina, $n=5$ para cada experimento. **(B)** A curva concentração-resposta para PE representa a média $\pm$ EPM e os valores experimentais de contração foram calculados em relação à resposta contrátil produzida pelo KCl (120 mmol/L), considerada como 100%. * $P<0,05$ vs. veículo (DMSO). A significância estatística dos dados foi determinada por meio do teste de variância (ANOVA *one way*) seguido do pós-teste de Newman-Keuls ou teste “*t*”.

4.4 - Avaliação do efeito da ET-1 nos níveis vasculares de proteínas O-GlcNAc durante a hipertensão DOCA-sal

Avaliamos se a ativação da via da ET-1 é um elemento fundamental para o aumento dos níveis vasculares de proteínas O-GlcNAc e, conseqüentemente, para o aumento da reatividade vascular na hipertensão dependente de mineralocorticoide. Para isso, utilizamos o tratamento de ratos DOCA-sal com um antagonista de receptores ET_A (atrasentan).

Após cinco semanas de tratamento, a pressão arterial sistólica (mmHg) foi maior nos animais DOCA-sal, quando comparada com ratos Uni (Uni: $124,9 \pm 3,6$ vs. DOCA-sal: $163,6 \pm 6,4$, $n = 6$; Tabela 3). Ratos DOCA-sal apresentaram um ganho de peso corporal menor, quando comparada com os ratos Uni (Tabela 3). O tratamento com atrasentan atenuou, mas não normalizou, a pressão arterial em ratos DOCA-sal ($137,5 \pm 5,74$ mmHg, $n=6$; Tabela 3), e não alterou o peso corporal final ou a glicemia dos animais DOCA-sal (Tabela 3).

A expressão gênica de pré-pró-ET-1 apresentou-se aumentada em aortas de ratos DOCA-sal (valor relativo: 1 Uni vs. $2,1 \pm 0,4$ DOCA-sal), e o tratamento com atrasentan não impediu o aumento da expressão gênica de mRNA pré-pró-ET-1 (valor relativo: $1,8 \pm 0,1$), conforme determinado por RT-PCR. Por outro lado, o antagonista ET_A normalizou os níveis vasculares de proteínas O-GlcNAc em ratos DOCA-sal (Figura 10A) e também diminuiu a resposta contrátil da aorta à PE (Figura 10B).

Estes resultados sugerem que a ativação dos receptores ET_A desempenha um papel importante no aumento dos níveis de proteínas O-GlcNAc mediado pela ET-1. Este resultado foi reforçado pelos nossos experimentos *in vitro*, onde a pré-incubação com atrasentan ($1 \mu\text{mol/L}$) atenuou os efeitos da incubação com ET-1 (24 horas), tanto nos níveis totais de proteínas O-GlcNAc como na reatividade vascular (Figura 11A e 11B, respectivamente).

Figura 10. O antagonista ET_A normalizou os níveis vasculares de proteínas O-GlcNAc e diminuiu a resposta contrátil da aorta à PE, em animais DOCA-sal. (A) Acima, imagens representativas de *western blot* e, abaixo, gráfico de barras demonstrando a expressão vascular de O-GlcNAc. Valores foram normalizados pela expressão de β -actina, $n=5$ para cada experimento. **(B)** Os pontos da curva concentração-resposta para PE representam a média $\pm$ EPM e os valores experimentais de contração foram calculados em relação à resposta contrátil produzida pelo KCl (120 mmol/L), considerada como 100%. * $P < 0,05$ vs. Uni. A significância estatística dos dados foi determinada por meio do teste de variância (ANOVA *one way*) seguido do pós-teste de Newman-Keuls ou teste “*t*”.

Figura 11. ET-1 aumentou os níveis vasculares de proteínas O-GlcNAc e seus efeitos vasculares foram prevenidos pelo antagonista dos receptores ET_A. (A) Acima, imagens representativas de *western blot* e, abaixo, gráfico de barras demonstrando a expressão vascular de O-GlcNAc. Valores foram normalizados pela expressão de β -actina, $n=5$ para cada experimento. (B) A curva concentração-resposta para PE representa a média $\pm$ EPM e os valores experimentais de contração foram calculados em relação à resposta contrátil produzida pelo KCl (120 mmol/L), considerada como 100%. * $P < 0,05$ vs. veículo (H_2O). A significância estatística dos dados foi determinada por meio do teste de variância (ANOVA *one way*) seguido do pós-teste de Newman-Keuls ou teste “*t*”.

5 – RESULTADOS (Parte 2)

5.1 - Avaliação do efeito vascular da ET-1 na presença de um inibidor da Rho cinase

Na segunda parte do nosso estudo, avaliamos se a O-GlcNAc contribui para os efeitos vasculares da ET-1, pela ativação da via RhoA/Rho cinase em CMLV. Para isso, diferentes tempos de incubação e concentrações de ET-1 foram utilizados para determinar as alterações nos níveis de proteínas O-GlcNAc em CMLV.

Assim como observamos em aortas torácicas de ratos Wistar, a ET-1 também produziu um aumento, tempo-dependente, nos níveis de O-GlcNAc em CMLV, apresentando um efeito mais expressivo em células tratadas por 24 horas (Figura 12A).

A incubação de CMLV com diferentes concentrações de ET-1 (0,1 nmol/L a 1 µmol/L, durante 24 horas) aumentou os níveis de O-GlcNAc, em comparação com as CMLV incubadas com veículo. Entretanto, não houve diferenças significativas nos níveis de proteínas O-GlcNAc entre as diferentes concentrações de ET-1 testadas (Figura 12B).

Os demais experimentos funcionais e moleculares foram realizados em CMLV incubadas por 24h com 0,1 µmol/L de ET-1. Esta concentração, como demonstrado anteriormente, foi capaz de aumentar os níveis de O-GlcNAc em aortas de ratos (LIMA *et al.*, 2008; LIMA *et al.*, 2010) e é largamente utilizada na literatura para a estimulação de células em cultura (YOGI *et al.*, 2007; SAKAI *et al.*, 2007), permitindo assim comparações entre essas duas condições experimentais.

A **B**

Figura 12. A ET-1 produziu aumento tempo-dependente nos níveis de O-GlcNAc em CMLV. CMLVs cultivadas de aorta torácica de ratos foram incubadas em duas condições distintas: **(A)** com ET-1 (0,1 $\mu\text{mol/L}$) em diferentes tempos (5 minutos 1, 3, 6, 12 ou 24 horas) ou **(B)** com ET-1 em diferentes concentrações (0,1 nmol/L a 1 $\mu\text{mol/L}$) por 24 horas. Acima, imagens representativas de *western blot* e, abaixo, gráficos de barras demonstrando a expressão vascular de O-GlcNAc. Valores foram normalizados pela expressão de β -actina, $n=5$ para cada experimento. * $p<0,05$ vs. Veículo (H_2O). A significância estatística dos dados foi determinada por meio do teste T-Student não pareado.

Como descrito no item 4.1, as diferenças na contração induzida pela PE, após a incubação com ET-1 ou PUGNAc, são mantidas nas artérias sem endotélio, em comparação com aortas estimuladas com veículo (Figura 13A).

Entretanto, esta diferença foi abolida após a incubação com o inibidor da Rho cinase [(Y-27632, 1 $\mu\text{mol/L}$ - 40 minutos; Figura 13B) (pD_2 : $7,8 \pm 0,1$ veículo vs. $7,9 \pm 0,1$ ET-1 vs. $7,6 \pm 0,25$ PUGNAc; E_{max} [% do KCl]: 98 ± 4 veículos vs. 121 ± 15 ET-1 vs. 105 ± 8 PUGNAc; $n=5$)].

A

B

Figura 13. Os efeitos vasculares da ET-1 e PUGNAc foram abolidos pelo inibidor da Rho cinase. (A) A incubação com ET-1 (n=8; 0,1 $\mu\text{mol/L}$) ou PUGNAc (n=8; 100 $\mu\text{mol/L}$) por 24 horas aumentou a contração para PE em aortas de ratos sem endotélio. **(B)** O efeito da ET-1 sobre as respostas da PE foi abolido pelo inibidor da cinase Rho Y-27632 (1 $\mu\text{mol/L}$, 40 minutos). Valores experimentais de contração foram calculados em relação à resposta contrátil produzida pelo KCl 120 mmol/L, que foi tomado como 100%. Os resultados são apresentados como média $\pm$ EPM de cada grupo experimental. * $p < 0,05$ vs. veículo (metanol). A significância estatística dos dados foi determinada por meio do teste de variância (ANOVA *one way*) seguido do pós-teste de Newman-Keuls.

O tratamento prévio de CMLV com ST045849 ou atrasentan preveniu o aumento dos níveis de proteínas O-GlcNAc, após a estimulação com ET-1 (Figura 14A). Um efeito semelhante foi observado quando a expressão gênica da OGT foi atenuada, após a transfecção das CMLV com siRNA para OGT.

Nesta condição, o efeito da ET-1 sobre os níveis de proteínas O-GlcNAc foi totalmente abolido (Figura 14B). A transfecção com siRNA para OGT diminuiu a expressão protéica em aproximadamente 60%, em relação ao siRNA controle negativo (Figura 15).

Figura 14. O efeito da incubação com ET-1 sobre os níveis de proteínas O-GlcNAc em CMLV foi prevenido pelo antagonista dos receptores ET_A, pela inibição seletiva da enzima OGT e pela transfecção com siRNA de interferência para OGT. Acima, imagens representativas de *western blot* e, abaixo, gráficos de barras demonstrando a expressão vascular de O-GlcNAc. Valores foram normalizados pela expressão de β-actina, n=5 para cada experimento. *P<0,05 vs. controle (DMSO), #P< 0,05 vs. controle (siRNA controle). A significância estatística dos dados foi determinada por meio do teste T-Student não pareado.

Figura 15. A transfecção com siRNA de interferência para OGT diminuiu a expressão desta enzima, na ausência e na presença de ET-1. Acima, imagens representativas de *western blot* e, abaixo, gráficos de barras demonstrando a expressão vascular da OGT. Valores foram normalizados pela expressão de β -actina, n=5 para cada experimento. *P< 0,05 vs. controle (siRNA controle). A significância estatística dos dados foi determinada por meio do teste T-Student não pareado.

5.2 - Avaliação do efeito da ET-1 na expressão das enzimas envolvidas na via da RhoA/Rho cinase em CMLV

Considerando que 1) a O-GlcNAc é uma modificação pós-traducional muito dinâmica que desempenha um papel fundamental nas vias de sinalização e que 2) a ET-1 estimula a via da RhoA/Rho cinase, a qual é importante na sensibilização ao Ca^{+2} em CMLV (AKIMOTO *et al.*, 2001); investigamos se a ET-1 aumenta a resposta vascular contrátil através da hiperativação da via RhoA/Rho cinase, em resposta aos altos níveis de O-GlcNAc.

Nossos dados demonstraram que a incubação de CMLV com ET-1 (0,1 $\mu\text{mol/L}$) não modificou a expressão protéica das formas totais de ROCK- α , ROCK- β (Figura 16A), CPI-17, MYPT-1 ou MLC (gráfico não demonstrados). Porém, aumentou a expressão das formas fosforiladas da CPI-17 (Tre³⁸) (Figura 16B) e da MYPT-1 (Tre⁸⁵³) (Figura 16D), as quais estão envolvidas na via RhoA/Rho cinase, através da inibição da miosina fosfatase.

O tratamento com ET-1 também aumentou os níveis da forma fosforilada de MLC (Tre¹⁸/Ser¹⁹) (Figura 16C), que está associada com a contração do músculo liso. O efeito da ET-1 sobre a atividade da CPI-17 (Figura 16B), MLC (Figura 16C) e MYPT-1 (Figura 16D) não foi observado quando CMLV foram tratadas com o inibidor da OGT (ST045849) ou previamente transfectadas com o siRNA para OGT (Figura 17). Além disso, o tratamento com atrasentan impediu que a ET-1 induzisse o aumento da expressão das formas fosforiladas do CPI-17 (Figura 16B), MLC (Figura 16C) e MYPT -1 (Figura 16D).

Figura 16. A inibição seletiva da enzima OGT e o bloqueio dos receptores ET_A atenuaram o efeito da incubação com ET-1 sobre a via RhoA/Rho cinase. O efeito da ET-1 na fosforilação da (B) CPI-17 Tre³⁸, (C) MLC Tre¹⁸/Ser¹⁹ e (D) MYPT-1 Tre⁸⁵³ não foi observado quando CMLV foram pré-incubadas com ST045849 ou com atrasentan. A incubação com ET-1 (0,1 μ mol/L), ST045849 (100 μ mol/L), ou atrasentan (1 μ mol/L) não modificou a expressão protéica da (A) ROCK- α e ROCK- β . Acima, imagens representativas de *western blot* e, abaixo, gráficos de barras demonstrando a expressão das proteínas envolvidas na via RhoA/Rho cinase. Valores foram normalizados pela expressão de β -actina ou pelas respectivas formas totais, n=5 para cada experimento. * P < 0,05 vs. veículo (DMSO). A significância estatística dos dados foi determinada por meio do teste T-Student não pareado.

Figura 17. A transfecção com siRNA de interferência para OGT preveniu os efeitos da ET-1 sobre a via RhoA/Rho cinase. O efeito da ET-1 na fosforilação da **(B)** CPI-17 Tre³⁸, **(C)** MLC Tre¹⁸/Ser¹⁹ e **(D)** MYPT-1 Tre⁸⁵³ não foi observado quando CMLV foram previamente transfectadas com o siOGT (100 nmol/L). A incubação com ET-1 ou siOGT não modificou a expressão protéica de **(A)** ROCK- α e ROCK- β . Acima, imagens representativas de *western blot* e, abaixo, gráficos de barras demonstrando a expressão das proteínas envolvidas na via RhoA/Rho cinase. Valores foram normalizados pela expressão de β -actina ou pelas respectivas formas totais, n=5 para cada experimento. * P< 0,05 vs. controle (siRNA controle). A significância estatística dos dados foi determinada por meio do teste T-Student não pareado.

Todas as evidências sugerem que a ET-1 induz a O-GlcNAc de proteínas que participam da via RhoA/Rho cinase. Esta modificação pós-traducional associada à ativação da RhoA/Rho cinase pode ser funcionalmente traduzida no aumento da reatividade vascular para estímulos contráteis. Esta hipótese é reforçada por experimentos complementares, onde observamos que a ET-1 aumenta a atividade (Figura 18A) e a expressão protéica (Figura 18B) da RhoA em CMLV, e este efeito foi abolido em CMLV previamente transfectadas com siOGT (Figura 18B), ou tratadas com o inibidor da OGT (Figura 18C) ou com atrasentan (Figura 18C).

Figura 18. O bloqueio dos receptores ET_A , a inibição seletiva da enzima OGT e a transfecção com siRNA de interferência para OGT preveniram o efeito da ET-1 no aumento da atividade e da expressão protéica da RhoA. **(A)** O gráfico de barras mostra o valor relativo na mudança da atividade da RhoA, com absorbância em 490nm. **(B)-(C)** Acima, imagens representativas de *western blot* e, abaixo, gráficos de barras demonstrando a expressão da proteína RhoA. Valores foram normalizados pela expressão de β -actina, $n=5$ para cada experimento. * $P < 0,05$ vs. controle (siRNA controle), # $P < 0,05$ vs. veículo (DMSO). A significância estatística dos dados foi determinada por meio do teste T-Student não pareado.

Por fim, avaliamos a expressão protéica do PDZ-Rho GEF e p115-Rho GEF, que levam à ativação da RhoA em CMLV, com a finalidade de esclarecer como a ET-1 promove o aumento nos níveis de O-GlcNAc, contribuindo para a ativação da via RhoA/Rho cinase. Também verificamos a expressão do fator inibidor da dissociação de GDP (Rho GDI). O tratamento com ET-1 não alterou a expressão da Rho GDI (Figura 19), mas aumentou a expressão das proteínas PDZ-Rho GEF e p115-Rho GEF. Este efeito foi abolido, quando CMLV foram previamente transfectadas com siRNA para OGT (Figura 20A), incubadas com o inibidor da OGT ou tratadas com o antagonista dos receptores ET_A (Figura 20B).

Figura 19. A incubação com ET-1, assim como o tratamento com atrasentan, a inibição seletiva da enzima OGT e a transfecção com siRNA OGT não alteraram a expressão da Rho GDI. Acima, imagens representativas de *western blot* e, abaixo, gráficos de barras demonstrando a expressão vascular da Rho GDI. Valores foram normalizados pela expressão de β -actina, n=5 para cada experimento.

Figura 20. O bloqueio dos receptores ET_A, a inibição seletiva da enzima OGT e a transfecção com siRNA OGT preveniram o efeito da ET-1 na expressão protéica de PDZ-Rho GEF e p115-Rho GEF. Acima, imagens representativas de *western blot* e, abaixo, gráficos de barras demonstrando a expressão vascular da PDZ-Rho GEF e da GEF p115-Rho. Valores foram normalizados pela expressão de β-actina, n=5 para cada experimento. * P< 0,05 vs. controle (siRNA controle), # P< 0,05 vs. controle (DMSO). A significância estatística dos dados foi determinada por meio do teste T-Student não pareado.

6 – DISCUSSÃO

A O-Glicosilação com *N*-acetilglucosamina (O-GlcNAc) é uma modificação pós-traducional que ocorre em proteínas nucleares e citoplasmáticas. O processo de O-GlcNAc em resíduos de Ser ou Tre é controlado diretamente pela atividade das enzimas OGT e OGA. A enzima OGT catalisa a adição de O-GlcNAc, enquanto que a OGA reverte este processo, catalisando a remoção hidrolítica de O-GlcNAc nas proteínas alvo. A atividade catalítica da OGT é controlada pela concentração do seu substrato, UDP-GlcNAc. A concentração deste substrato é altamente sensível ao fluxo de nutrientes, através da via de biosíntese de hexosamina (VBH). Praticamente todas as classes de proteínas, incluindo fatores de transcrição, são alvo da O-GlcNAc (LACZY *et al.*, 2009; NGOH *et al.*, 2010). Apesar de proteínas com importante papel na função vascular serem alvo desta modificação, a O-GlcNAc ainda é uma área relativamente inexplorada no que se refere a função vascular. Recentemente, foi relatado que o tratamento com inibidor seletivo da OGA (PUGNAc) aumenta o conteúdo de proteínas O-GlcNAc, assim como promove aumento da reatividade vascular para estímulos contráteis (LIMA *et al.*, 2008). Evidências do nosso laboratório demonstraram que a expressão de proteínas modificadas pela O-GlcNAc está aumentada em artérias de ratos hipertensos DOCA-sal (LIMA *et al.*, 2009). Isto indica que esta modificação pós-traducional pode exercer um importante papel na função vascular.

A ET-1 é o peptídeo mais importante e abundante da família das endotelinas. A produção deste peptídeo encontra-se aumentada na vasculatura de diferentes modelos de hipertensão sensível ao sal, onde incluímos a hipertensão DOCA-sal (um modelo de hipertensão induzida pelo excesso de mineralocorticoide) (SCHIFFRIN 2005; DHAUN *et al.*, 2008; KOHAN 2008). Nestes animais, a ET-1 não só induz vasoconstrição, mas também ativam fatores de transcrição responsáveis pelo aumento coordenado da produção de várias citocinas pró-inflamatórias e enzimas, culminando em estresse oxidativo, inflamação e lesão tecidual (SCHIFFRIN 2005; HYNENEN *et al.*, 2006; SCHIFFRIN *et al.*, 1998), os quais estão diretamente associados à disfunção vascular na hipertensão arterial.

Considerando que: 1) proteínas importantes na função cardiovascular são alvos da O-GlcNAc; 2) os níveis de proteínas O-GlcNAc estão significativamente aumentados na vasculatura de ratos hipertensos DOCA-sal ou hipertensos induzidos por angiotensina II e sal (LIMA *et al.*, 2009; RIGSBY *et al.*, 2009); 3) a ET-1 além de

encontrar-se aumentada na vasculatura de modelos de hipertensão sensível ao sal (SCHIFFRIN 2005; TOSTES *et al.*, 2005), também contribui para a disfunção vascular em artérias de ratos DOCA-sal; e 4) níveis elevados da O-GlcNAc estão associados à disfunção vascular (LIMA *et al.*, 2008; LIMA VV *et al.*, 2009; LIMA *et al.*, 2009); decidimos investigar se o aumento de proteínas O-GlcNAc contribui para os efeitos da ET-1 na indução da disfunção vascular.

Inicialmente nossos dados demonstram, pela primeira vez, que a ET-1 aumenta os níveis vasculares de proteínas O-GlcNAc em diferentes condições. Em nossos experimentos *in vitro*, observamos que 0,1 $\mu\text{mol/L}$ de ET-1 é capaz de aumentar os níveis de proteínas O-GlcNAc, agudamente, tanto em CMLV como em aortas de ratos normotensos. Nos modelos de exposição *in vivo*, o resultado foi semelhante. A infusão crônica de ET-1 por 14 dias foi capaz de aumentar os níveis vasculares de proteínas O-GlcNAc. O mesmo ocorreu com ratos DOCA-sal, cuja expressão gênica de pré-pró-ET-1 apresentou-se aumentada, concomitantemente com o aumento de proteínas O-GlcNAc, quando comparada com ratos Uni.

Além de aumentar os níveis vasculares de proteínas O-GlcNAc, a incubação com ET-1 por 24h, também aumenta a resposta contrátil de aortas de ratos para agonistas vasoconstritores. Um efeito semelhante foi observado em aortas incubadas com PUGNAc. Essa ferramenta farmacológica foi utilizada para aumentar os níveis vasculares de proteínas O-GlcNAc, ocasionando o aumento da resposta contrátil para PE (LIMA *et al.*, 2008). A infusão crônica de ET-1 não alterou a glicemia dos animais, sugerindo que o aumento dos níveis vasculares de proteínas O-GlcNAc não se correlacionam com a glicemia, neste modelo *in vivo*. Entretanto, a infusão de ET-1 aumentou a resposta contrátil para PE em comparação com os respectivos controles, assim como foi demonstrado em outros estudos (SCHIFFRIN 2005; Y. WANG *et al.*, 2004).

A exposição à ET-1 também aumentou a resposta contrátil para serotonina demonstrando que o aumento da O-GlcNAc, associado aos níveis elevados de ET-1, não interfere exclusivamente com as respostas contráteis mediadas por agonistas α -1 adrenérgicos. Porém é válido mencionar que estudos demonstraram que a ET-1 aumenta a sensibilidade da parede vascular a outras substâncias; como noradrenalina e seronina, aumentando as reações pressoras a estas (Z. H. YANG *et al.*, 1990). Portanto é possível que o aumento da contração induzida por serotonina,

em aortas incubadas com ET-1, seja uma resposta independente dos níveis elevados de O-GlcNAc.

Na vasculatura, os receptores ET_A e ET_B são responsáveis pelos efeitos vasoconstritores da ET-1 (HAYNES *et al.*, 1993). Ambos receptores são expressos nas células musculares lisas. Porém, os receptores ET_A são predominantes na resposta de vasoconstrição induzida pela ET-1, tanto em artérias como em veias (SCHIFFRIN 2005; SCHIFFRIN *et al.*, 1998). Além disso, White e colaboradores demonstraram que, ao contrário da ET-1, os agonistas seletivos para receptores ET_B não promovem contração em artéria aorta de ratos. Eles também observaram que o 4-Ala-ET-1 (agonista seletivo para receptores ET_B) não antagoniza o efeito vasoconstritor da ET-1, como observado com o BQ-123 (antagonista competitivo de receptores ET_A) (WHITE *et al.*, 1993). Desta forma, os antagonistas dos receptores ET_A são largamente utilizados na tentativa de prevenir ou atenuar os efeitos da ET-1 na vasculatura ou mais especificamente na artéria aorta de ratos.

Em estudos preliminares, foi demonstrado que o aumento dos níveis de proteínas O-GlcNAc aumenta as respostas aos estímulos contráteis (LIMA *et al.*, 2008) e que o aumento da O-GlcNAc também está associado com a contratilidade vascular aumentada na hipertensão DOCA-sal (LIMA *et al.*, 2009). Nosso trabalho demonstra que os tratamentos agudo e crônico com antagonista dos receptores ET_A (atrasentan) previne as alterações nos níveis de proteínas O-GlcNAc induzida pela ET-1, além de normalizar a resposta contrátil à PE, em artérias de ratos DOCA-sal.

Os resultados obtidos com o tratamento com atrasentan, *in vivo*, poderiam sugerir que a redução da modificação das proteínas seria em consequência a uma diminuição da pressão arterial. No entanto, observamos que o tratamento crônico com atrasentan atenuou, mas não normalizou a pressão arterial de ratos DOCA-sal. Além disso, a infusão crônica de ET-1 não produziu aumento significativo na pressão arterial, como também demonstrado por Wang e Wang (Y. WANG *et al.*, 2004), porém aumentou os níveis vasculares de O-GlcNAc e a resposta contrátil para PE. Esses dados indicam que a modificação das proteínas por O-GlcNAc não se correlaciona diretamente com alterações da pressão arterial, mas sim com modificações na função vascular.

Como os receptores ET_A são altamente expressos em CMLV e a ET-1 exibe alta afinidade a estes receptores (YAZAWA *et al.*, 1993; BOUALLEGUE *et al.*, 2007), decidimos avaliar o efeito da ET-1 em células previamente incubadas com

atrasentam. Verificamos que o aumento dos níveis de proteínas O-GlcNAc em CMLV, causada pela ET-1, não é observado quando as células são previamente incubadas com atrasentan. Juntos, nossos resultados indicam que a ativação dos receptores ET_A é necessária para que a ET-1 induza a O-GlcNAc de proteínas vasculares.

Estudos realizados em nosso laboratório sugerem que o aumento da O-GlcNAc na vasculatura aumenta a resposta vascular aos estímulos de contração (LIMA *et al.*, 2008; LIMA *et al.*, 2009; LIMA *et al.*, 2010; LIMA *et al.*, 2010), indicando que a O-GlcNAc modula a reatividade vascular, além de estar associada à disfunção vascular em diversas patologias, como por exemplo, na hipertensão arterial e diabetes (LACZY *et al.*, 2009; MUSICKI *et al.*, 2005; VOSSELLER *et al.*, 2002; FEDERICI *et al.*, 2002). Em condições de estresse crônico, o processo de O-GlcNAc parece contribuir para a disfunção cardíaca. Diversos estudos demonstraram que o aumento do metabolismo de glicose, através da via VBH, associado ao aumento dos níveis de proteínas O-GlcNAc contribui para os efeitos adversos do diabetes no coração (FULOP *et al.*, 2007; REN *et al.*, 1997; DAVIDOFF *et al.*, 1997; DUTTA *et al.*, 2002; REN *et al.*, 1997). Além disso, o aumento da O-GlcNAc também interfere com muitos aspectos do processo inflamatório (JAMES *et al.*, 2002; GOLKS *et al.*, 2007).

Paradoxalmente, uma série de estudos tem mostrado, consistentemente, que a ativação de vias que levam à formação de O-GlcNAc melhora a sobrevivência celular e a função cardíaca, após infarto agudo do miocárdio ou em condições de estresse (lesão causada por *isquemia*/reperfusão, traumas hemorrágicos), enquanto que a inibição do processo de O-GlcNAc diminui a sobrevivência das células do miocárdio (LACZY *et al.*, 2009; CHATHAM *et al.*, 2008; NGOH *et al.*, 2010; JONES *et al.*, 2008; S. YANG *et al.*, 2006). Isto corrobora relatos anteriores, onde demonstrou-se que o estresse leva ao aumento transitório nos níveis de O-GlcNAc, o que está associado com maior tolerância ao estresse (ZACHARA *et al.*, 2006; ZACHARA *et al.*, 2004; ZACHARA *et al.*, 2004).

Efeitos anti-inflamatórios da glucosamina também foram relatados em um modelo de lesão arterial. A administração aguda de glucosamina ou PUGNAc, o que acarreta aumento da O-GlcNAc, inibiu a resposta inflamatória aguda e as lesões da camada neointima em artéria carótida de ratas ovariectomizadas, após lesão por balão. Os níveis de proteínas modificadas pela O-GlcNAc diminuíram

acentuadamente em artérias lesionadas, mas o tratamento com glucosamina e PUGNAc evitaram a diminuição dos níveis de O-GlcNAc. As lesões, ocasionadas pelo balão, também induziram aumento da expressão de mediadores pró-inflamatórios e da infiltração de neutrófilos e monócitos, eventos que foram prevenidos pelo tratamento com glucosamina e PUGNAc (XING *et al.*, 2008).

Deve-se notar, no entanto, que os efeitos anti-inflamatórios associados à elevação aguda de O-GlcNAc no coração não podem ser generalizados a outras células. Por exemplo, o processo de O-GlcNAc é essencial para a ativação de linfócitos T e B. A modificação pela O-GlcNAc, a qual encontra-se aumentada logo após a ativação das células linfóides, parece ser necessária para a translocação nuclear de fatores de transcrição. Deste modo, a transfecção com siRNA para OGT em células T leva a uma ativação deficiente dos fatores de transcrição NFAT (fator nuclear de células T ativadas) e NF-kappaB, reduz a produção de IL-2 e, consequentemente, impede a ativação de células T (GOLKS *et al.*, 2007; GOLKS *et al.*, 2008).

Devido à paradoxal relação entre a O-GlcNAc e o sistema cardiovascular, é evidente que vários aspectos ainda precisam ser considerados antes que se possa classificar a O-GlcNAc como um processo "benéfico/protetor" ou "adverso/nocivo". O primeiro aspecto que deve ser considerado são as diferenças entre os efeitos agudos e crônicos da O-GlcNAc. É possível que o aumento agudo de proteínas vasculares pela O-GlcNAc possa neutralizar estímulos estressores promovendo ações de proteção, enquanto que o aumento crônico da O-GlcNAc pode contribuir para a disfunção vascular através da modulação de outras vias de sinalização. Nesta mesma direção, outra explicação alternativa, sugerida por Fulop e colaboradores, é o conceito de alostasia (FULOP *et al.*, 2007). De acordo com os autores, a resposta biológica inicial a um estresse agudo é a ativação de processos com capacidade protetora, o que proporciona uma melhora da sobrevivência. Por outro lado, quando o estresse se torna mais frequente ou contínuo, a ativação dos mesmos processos resulta no desenvolvimento de patologias (FULOP *et al.*, 2007). Portanto, se por um lado o aumento da O-GlcNAc é uma resposta da sobrevivência aguda, os efeitos fisiopatológicos podem ser uma consequência da ativação crônica, como observado em doenças metabólicas. O segundo aspecto, pode ocorrer pelas condições iniciais da célula quando os componentes do processo de O-GlcNAc são manipulados (hiperexpressão ou supressão da OGA, OGT ou GFAT, inibição

farmacológica, etc). A remoção ou a adição de O-GlcNAc às células pode produzir efeitos opostos ou diferentes, dependendo do estado metabólico, energético ou redox inicial da célula. Um terceiro aspecto, pode estar relacionado ao fato de que o aumento global da O-GlcNAc possa produzir diferentes efeitos de acordo com as proteínas específicas que são alvo desta modificação. Além do mais, o aumento dos níveis de O-GlcNAc pode interferir de formas distintas para uma resposta específica em diferentes tecidos ou órgãos.

É válido mencionar que não só no sistema cardiovascular o processo de O-GlcNAc apresenta efeito "paradoxal". No entanto, conforme mencionado por Marsh e Chatham (MARSH *et al.*, 2011) em um comentário editorial relacionado a um dos nossos estudos: "Nosso conhecimento do papel(eis) da O-GlcNAc na regulação do sistema cardiovascular está ainda em sua infância (MARSH *et al.*, 2011)...". Consequentemente, muito precisa ser feito e respondido antes que nós tenhamos uma visão clara das associações entre o sistema cardiovascular e a modificação pela O-GlcNAc.

Futuras investigações são definitivamente necessárias para melhor caracterizar os efeitos vasculares da O-GlcNAc e identificar proteínas específicas na vasculatura que são alvo da O-GlcNAc, bem como identificar mecanismos que regulem a atividade das enzimas OGT e OGA em células vasculares.

A fim de esclarecer algumas dessas questões, decidimos avaliar o efeito da ET-1 na expressão das enzimas OGT e OGA. Nossos resultados demonstraram que a incubação com ET-1 (0,1 $\mu\text{mol/L}$) produz diminuição transitória e tempo-dependente na expressão vascular da OGT. Curiosamente, a incubação com PUGNAc, a qual promove aumento dos níveis de proteínas O-GlcNAc em artérias de ratos controle, (LIMA *et al.*, 2008) também diminuiu a expressão vascular da OGT (LIMA *et al.*, 2008). Portanto, a diminuição da atividade da OGT pode representar um mecanismo compensatório, em resposta aos altos níveis de proteínas O-GlcNAc. Entretanto, aortas de ratos tratados cronicamente com baixas doses de ET-1, que também apresentam aumento de proteínas O-GlcNAc, não demonstraram alterações na expressão vascular da OGT. Isso pode estar relacionado às mudanças na expressão transitória da OGT, produzida pela ET-1. É possível que a expressão da OGT tenha sido verificada em um momento (após 14 dias), onde a expressão dessa enzima já retornou aos níveis basais, como é o caso da expressão da OGT após 24h de incubação com ET-1, *in vitro*.

Um trabalho recente de Clarke e colaboradores (CLARKE *et al.*, 2008) demonstrou que anticorpos podem ser utilizados para inibir seletivamente cascatas de sinalização em CMLV de segmentos isolados de artérias. Nosso laboratório vem realizando experimentos em artérias incubadas com anticorpos neutralizantes incubados por 24 horas, utilizando esta abordagem inovadora como um método adicional de inibição molecular, complementando nossos estudos farmacológicos (GIACHINI *et al.*, 2009; LIMA *et al.*, 2010). Em nossos experimentos, a técnica do chariot foi utilizada para promover a internalização de anticorpos neutralizantes contra a enzima OGT, em anéis de aorta. Os efeitos da ET-1 não foram observados quando os vasos foram previamente transfectados com anticorpos contra OGT, fato que não ocorreu quando um anticorpo anti-IgG de coelho foi utilizado como controle adicional. Este resultado foi reforçado por experimentos em que as artérias foram incubadas com inibidor seletivo da OGT (ST045849). Este inibidor farmacológico atenuou os efeitos da ET-1, tanto em relação aos níveis vasculares de proteínas O-GlcNAc, como no aumento da reatividade vascular.

Estes resultados evidenciaram o importante papel da enzima OGT no aumento dos níveis de proteínas O-GlcNAc, após a estimulação de aortas com ET-1. Considerando estas evidências, realizamos experimentos adicionais onde a expressão gênica da OGT foi atenuada pela transfecção com siRNA para OGT, em CMLV. Os efeitos da ET-1 no aumento dos níveis de proteínas O-GlcNAc também não foram observados quando CMLV foram previamente transfectadas com siOGT. Além disso, os efeitos da ET-1 também foram prevenidos quando as células foram incubadas com ST045849. Com base nessas observações, concluímos que os efeitos da ET-1 sobre os níveis de proteínas O-GlcNAc são mediados pela atividade da OGT. Entretanto, a expressão protéica da OGA também diminuiu após o tratamento com ET-1, como demonstrado em aortas incubadas com PUGNAc (LIMA *et al.*, 2008) ou em animais hipertensos DOCA-sal (LIMA *et al.*, 2009). Além disso, a infusão com ET-1, por 14 dias, reduziu a expressão da OGA em aorta torácica. Sendo assim, o aumento vascular de proteínas O-GlcNAc, *in vivo* e *in vitro*, induzido pela ET-1 também pode estar sendo mediado pela diminuição da expressão/atividade da enzima OGA.

Assim como o processo de O-GlcNAc, as enzimas chaves que controlam esta modificação também estão associadas, de formas distintas, a outras patologias. Em um estudo de Fulop e colaboradores (FULOP *et al.*, 2007) foi demonstrado que com

o desenvolvimento de ratos obesos Zucker (ZDF), um modelo de diabetes tipo 2, ocorre uma deficiência no funcionamento mecânico dos cardiomiócitos, onde observa-se comprometimento do relaxamento. Isto é acompanhado por um significativo aumento dos níveis de proteínas O-GlcNAc e de UDP-GlcNAc, mas não do aumento da expressão da enzima OGT. Estas alterações são encontradas em cardiomiócitos de animais com 22 semanas de idade, mas não com 6 semanas de idade. Por outro lado, houve diminuição significativa dos níveis globais de O-GlcNAc em cardiomiócitos de ratos ZDF magros de 22 semanas, quando comparado com ratos de 6 semanas. Esta diminuição foi associada com a diminuição da expressão OGT nos ratos ZDF magros de 22 semanas de idade (FULOP *et al.*, 2007).

Demonstramos que a infusão de ET-1, por 14 dias, reduz a expressão da OGA e que a incubação de segmentos arteriais com ET-1, por 24h, modifica expressão protéica da OGT e da OGA. Portanto, é provável que o aumento da ativação dos receptores da ET-1 module a atividade de transcrição, induzindo ou suprimindo a expressão das enzimas que regulem os níveis de O-GlcNAc.

Durante a última década, uma onda de descobertas sobre o processo de O-GlcNAc revelou novos papéis desta modificação no sistema cardiovascular. No entanto, um dos desafios centrais, especificamente para a vasculatura, será entender as vias de sinalização modificadas por este processo. Neste sentido, estudos recentes demonstraram que várias proteínas, que pertencem a diferentes grupos funcionais, podem ser modificadas diretamente pela O-GlcNAc (HART *et al.*, 2007; FULOP *et al.*, 2007). Proteínas com importante papel na função vascular, tais como eNOS, SERCA, PLC, PKC são alvos desta modificação pós-traducional. Considerando que o aumento nas contrações da aorta para PE, após o tratamento com PUGNAc ou ET-1, foi abolido pelo inibidor de Rho cinase Y-27632 e que a ET-1 ativa a via de sinalização da RhoA/Rho cinase (IVEY *et al.*, 2008), decidimos investigar se aumento dos níveis de proteínas O-GlcNAc modifica a via RhoA/Rho cinase.

A relação funcional inversa entre o óxido nítrico (NO) e a via de sinalização da RhoA/Rho cinase (BIVALACQUA *et al.*, 2004), poderia ser uma das explicações para nossos resultados funcionais. Um dos mecanismos pelo qual o NO induz vasodilatação é através da inibição da via de sinalização da RhoA/Rho cinase (BIVALACQUA *et al.*, 2004; CALO *et al.*, 2007; SAUZEAU *et al.*, 2000; CHITALEY *et al.*, 2002). O NO se liga à enzima guanilato ciclase solúvel das células de músculo

liso, causando aumento de 3'5' monofosfato cíclico de guanosina (cGMP) e a subsequente ativação da proteína cinase dependente de cGMP (cGK) levando a inibição da RhoA (SAUZEAU *et al.*, 2000; SAWADA *et al.*, 2001). RhoA recombinante é fosforilada pela cGK no sítio Ser¹⁸⁸, resultando na inibição da RhoA na formação das fibras de estresse. Além disso, o cGK constitutivamente ativo inibe a translocação, induzida pela PE, da RhoA do citoplasma para a membrana plasmática em aorta de ratos, indicando inativação da RhoA pela via NO/cGK (BIVALACQUA *et al.*, 2004; SAWADA *et al.*, 2001). Além disso, o aumento dos níveis de O-GlcNAc está associado à diminuição da fosforilação da eNOS no resíduo de Ser¹¹⁷⁷ (eNOS-Ser¹¹⁷⁷), inibindo sua atividade e reforçando o conceito de que a O-GlcNAc modula a reatividade vascular, em parte por comprometimento da função endotelial (LIMA *et al.*, 2009; KREPPEL *et al.*, 1999; DU *et al.*, 2001; MUSICKI *et al.*, 2005; FEDERICI *et al.*, 2002). Portanto, é possível que o aumento da atividade da via da RhoA/Rho cinase, em resposta a redução da biodisponibilidade do NO, possa contribuir para o aumento da reatividade à estímulos vasoconstritores na presença de níveis aumentados de O-GlcNAc. No entanto, nossos dados fornecem evidências, pela primeira vez, de que a ET-1, bem como a incubação com PUGNAc, também aumenta a reatividade vascular para PE, em aortas sem endotélio, sugerindo que esta modificação pós-traducional aumenta a contração vascular alterando diretamente a função das CMLVs, independentemente das ações do NO.

Recentemente, alguns estudos demonstraram que a MLC é um alvo da O-GlcNAc (HEDOU *et al.*, 2007; CIENIEWSKI-BERNARD *et al.*, 2004). Nossos dados demonstram que a ET-1 aumenta a expressão das formas fosforiladas da MYPT-1 (Tre⁸⁵³), CPI-17 (Tre³⁸) e da MLC (Tre¹⁸/Ser¹⁹). Porém, os efeitos da ET-1 na ativação dessas proteínas não são observados quando as células são previamente transfectadas com siOGT, tratadas com o antagonista do receptor ET_A ou tratadas com o inibidor da OGT. Sabe-se que a estimulação dos receptores ET_A, pela ET-1, induz a ativação da via RhoA/Rho cinase (HOMMA *et al.*, 2007; CHIBA *et al.*, 2005). Neste estudo, nós demonstramos pela primeira vez que esta ativação pode ser mediada pelo aumento de proteínas O-GlcNAc.

A O-GlcNAc pode interferir nos efeitos da fosforilação tornando as fibras musculares mais sensíveis ao Ca²⁺ e interferindo na interação dos miofilamentos, como sugerido em outros estudos (LACZY *et al.*, 2009; HEDOU *et al.*, 2007). Assim,

um desequilíbrio entre a fosforilação e a O-GlcNAc dessas proteínas pode alterar as interações entre actina e miosina, bem como a atividade da miosina, promovendo e facilitando a contração vascular.

Cheung e colaboradores demonstraram que alterações na atividade de proteínas, tais como MYPT-1, bem como alterações na fisiologia celular estão associadas com alterações nos níveis de O-GlcNAc (ZACHARA *et al.*, 2006; CHEUNG *et al.*, 2008). Assim, pode-se especular que o aumento vascular da O-GlcNAc ocasionado pela estimulação com ET-1 resulta em aumento da atividade da via RhoA/Rho cinase, potencializando as respostas vasculares a estímulos contráteis. Reforçando essa hipótese, nossos dados demonstram que a ET-1 aumenta a expressão e a atividade da RhoA em CMLV, e este efeito é abolido pela prévia transfecção com siOGT ou o tratamento com o inibidor da OGT. Além disso, Kim e colaboradores observaram que a glucosamina, além de aumentar os níveis globais de O-GlcNAc, também aumenta a reatividade vascular para estímulos contráteis, através do aumento da fosforilação da MLC, MYPT1 e CPI-17, e da atividade da RhoA. Estes efeitos foram abolidos na presença de um inibidor da OGT (KIM DO *et al.*, 2011).

As Rho GEFs promovem a ativação da RhoA, permitindo a troca de nucleotídeos entre a RhoA-GDP para RhoA-GTP. Existem três fatores de troca de GTP/GDP (Rho GEFs) identificados em células do músculo liso: PDZ-Rho GEF, LARG e p115-RhoGEF. O aumento da expressão ou da atividade das proteínas Rho GEFs favorece a contração do músculo liso, através de mecanismos dependentes da RhoA. Assim como demonstrado em outros estudos (HOMMA *et al.*, 2007; SCHERER *et al.*, 2002; ALLAHDAI *et al.*, 2007), observamos que o tratamento com ET-1 aumenta a expressão das proteínas PDZ-Rho GEF e p115- Rho GEF. Nosso trabalho mostra evidências de que esse efeito é bloqueado quando CMLVs são previamente transfectadas com siOGT, incubadas com o inibidor da OGT ou antagonista de receptores ET_A, fortalecendo ainda mais a hipótese de que o aumento vascular da O-GlcNAc pela ET-1 pode resultar em aumento da atividade da via RhoA/Rho cinase, levando ao aumento da contratilidade vascular.

Por outro lado, estudos funcionais demonstraram que a fosforilação da CPI-17 também pode ser mediada pela PKC, além da Rho cinase. A PKC é capaz de fosforilar a enzima CPI-17, que por sua vez inibe a miosina fosfatase, prolongando a fosforilação da MLC e, conseqüentemente, aumentando a contração do músculo liso

vascular (NUNES *et al.*, 2010; BUDZYN *et al.*, 2006; WOODSOME *et al.*, 2001). A ativação da PKC não só medeia a contração vascular induzida pela ET-1 (ALLAHDADI *et al.*, 2008; RAINBOW *et al.*, 2009; CAIN *et al.*, 2002) e regula a expressão de receptores de ET-1 (NILSSON *et al.*, 2008), como também está intimamente ligada à regulação da hipertrofia e proliferação, mediada pela ET-1 (BOUALLEGUE *et al.*, 2007). A ativação da PKC (PKC- δ), via fosforilação da STAT3, também medeia a capacidade da ET-1 em induzir a diminuição dos níveis de proteína eNOS arterial e a geração de NO (SUD *et al.*, 2009), bem como a formação de ânion superóxido vascular, induzido pela ET-1 (MATSUO *et al.*, 2009).

Dados do nosso laboratório, obtidos em experimentos de imunoprecipitação, realizados em segmentos vasculares, mostram que diferentes isoformas da PKC, incluindo PKC- α , - β II e - ϵ , são alvos da modificação O-GlcNAc (LIMA VV *et al.*, 2009). Além disso, o inibidor da PKC (GF109203X) também atenuou os efeitos contráteis do PUGNAc na reatividade vascular. A adição de GF109203X (10 μ mol/L) em artérias contraídas com PE resulta em inibição tempo-dependente da resposta contrátil, que é maior nas artérias previamente incubadas com PUGNAc. Finalmente, a contração induzida por PDBu (10 nmol/L), um ativador de PKC, é aumentada em aortas incubadas com PUGNAc, em comparação com o grupo controle (HARDY *et al.*, 2010). O substrato de cinase C rico em alanina miristolada (MARCKS) representa um substrato específico da PKC e a fosforilação da MARCKS é considerada uma medida direta para a atividade da PKC (GALLANT *et al.*, 2005; PORUMB *et al.*, 1997; GRAFF *et al.*, 1989; HARTWIG *et al.*, 1992). De acordo com nossos dados preliminares, a fosforilação da MARCKS é maior em aortas incubadas com PUGNAc, indicando que o aumento da O-GlcNAc contribui para o aumento da ativação da PKC (LIMA VV *et al.*, 2009). Juntos, esses resultados sugerem que o aumento vascular da O-GlcNAc aumenta a ativação da PKC, contribuindo para o aumento da contração vascular. Portanto, é provável que a modificação das isoformas da PKC encontrada na vasculatura, como PKC- α , PKC- β , PKC- γ , PKC- ϵ , e PKC- ζ , pela O-GlcNAc, possa interferir com processos vasculares regulados por estas enzimas (SALAMANCA *et al.*, 2005). Frente ao exposto, devemos considerar que a ativação da PKC, de certa forma, pode favorecer os efeitos da ET-1 em aumentar a atividade da via RhoA/Rho cinase mediada pelo aumento dos níveis de proteínas O-GlcNAc.

Os mecanismos pelos quais a O-GlcNAc leva à ativação dos componentes da via RhoA/Rho cinase ainda não são conhecidos. Um possível mecanismo inclui as mudanças nos níveis de fosforilação destes componentes. A relação entre a O-GlcNAc e a fosforilação é obviamente complexa, mas pode ser uma evidência para compreendermos os efeitos da adição da O-GlcNAc às proteínas com importante papel na função vascular. Já sabemos que ambas as modificações pós-traducionais ocorrem em resíduos de serina e treonina, são adicionadas e removidas dinamicamente nesses resíduos em resposta a diversos estímulos celulares e, consequentemente, alteram a função e a associação entre as proteínas alvo (ZACHARA *et al.*, 2006; COMER *et al.*, 2001; MUSICKI *et al.*, 2005; XING *et al.*, 2008). Foi demonstrado que o aumento da O-GlcNAc, em um lisato de cultura de fibroblastos, diminui a fosforilação em mais de 280 sítios e provoca um aumento da fosforilação em 148 sítios, demonstrando que a interação entre essas duas modificações pós-traducionais é bastante relevante (Z. WANG *et al.*, 2008). Podemos especular que a modificação pela O-GlcNAc em sítios próximos ou adjacentes aos sítios onde ocorre a fosforilação, pode promover a ativação de proteínas contráteis, diminuir a atividade das proteínas envolvidas no processo de relaxamento ou até mesmo promover a dessensibilização de receptores para ET-1. Além disso, foi demonstrado que o processo de fosforilação afeta diretamente a expressão e a atividade OGT (CHEUNG *et al.*, 2008). Portanto, a interação recíproca entre a O-GlcNAc e a fosforilação pode representar um dos mecanismos pelos quais o aumento da O-GlcNAc promove alterações na reatividade vascular.

Nosso trabalho apresenta algumas evidências dos mecanismos que contribuem para a disfunção vascular associada ao aumento dos níveis de O-GlcNAc, mas ao mesmo tempo abre uma ampla gama de questões que ainda devem ser respondidas, tais como: 1) quais são os mecanismos que correlacionam os receptores da ET-1 a alterações na expressão ou atividade das enzimas OGA e OGT e, consequentemente, aos níveis globais de O-GlcNAc?; 2) outros agentes vasoativos, como a angiotensina II, também induzem seus efeitos, parcialmente, através da modificação de proteínas pela O-GlcNAc? Enfim, um intrigante desafio para o futuro será entender melhor a dinâmica celular desta modificação, bem como as vias de sinalização e mecanismos pelos quais a O-GlcNAc regula a expressão ou atividade de proteínas específicas da vasculatura e as consequências fisiológicas deste evento.

7 – CONCLUSÃO

Nossos resultados nos permitem concluir que a exposição à ET-1, *in vitro* e possivelmente *in vivo*, é capaz de aumentar os níveis vasculares globais de proteínas O-GlcNAc e esta alteração aumenta a reatividade vascular aos estímulos de contração, através da ativação da via RhoA/Rho cinase. Nossos dados também sugerem que a ativação dos receptores ET_A é necessária para que a ET-1 induza a O-GlcNAc de proteínas vasculares. O tratamento com atrasentan é capaz de prevenir as alterações nos níveis de proteínas O-GlcNAc induzida pela ET-1, e também normalizar a resposta contrátil à PE, em artérias de ratos DOCA-sal. Além disso, demonstramos que a estimulação com ET-1 resulta em diminuição da expressão protéica da OGT e OGA. A diminuição da atividade da OGT pode representar um mecanismo compensatório, em resposta aos altos níveis de proteínas O-GlcNAc. E o aumento vascular de proteínas O-GlcNAc, induzido pela ET-1, pode estar sendo mediado pela diminuição da expressão/atividade da enzima OGA.

Nossos resultados sugerem que o aumento de proteínas O-GlcNAc, induzido pela ET-1, pode representar um novo mecanismo que contribui para os efeitos vasculares deste potente peptídeo. Do ponto de vista clínico, nossos resultados também auxiliam a compreensão dos mecanismos pelos quais a O-GlcNAc altera a função vascular e abre a possibilidade que a O-GlcNAc venha a representar um novo alvo terapêutico para o tratamento de condições patológicas associadas ao aumento da expressão de ET-1, como é o caso da hipertensão sensível ao sal.

8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

SAFAR, M.E.; BOUDIER H.S. Vascular development, pulse pressure, and the mechanisms of hypertension. **Hypertension**, V. 46, p. 205-9, 2005.

SEKO, T.; ITO M.; KUREISHI Y.; OKAMOTO R.; MORIKI N.; ONISHI K.; ISAKA N.; HARTSHORNE D.J.; NAKANO T. Activation of RhoA and inhibition of myosin phosphatase as important components in hypertension in vascular smooth muscle. **Circ Res**, V. 92, p. 411-8, 2003.

NUNES, K.P.; RIGSBY C.S.; WEBB R.C. RhoA/Rho-kinase and vascular diseases: what is the link? **Cell Mol Life Sci**, V. 22, p. 3823-36, 2010.

WELLS, L.; VOSSELLER K.; HART G.W. Glycosylation of nucleocytoplasmic proteins: signal transduction and O-GlcNAc. **Science**, V. 291, p. 2376-8, 2001.

HART, G.W.; HOUSLEY M.P.; SLAWSON C. Cycling of O-linked beta-N-acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins. **Nature**, V. 446, p. 1017-22, 2007.

VARKI, A.; CUMMINGS R.D.; ESKO J.D.; FREEZE H.H.; STANLEY P.; BERTOZZI C.R.; HART G.W.; ETZLER M.E. Essentials of Glycobiology. 2nd edition. TCoG Editors. **Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 2009.

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

TAYLOR, M.E.; DRICKAMER K. Introduction to glycobiology / Maureen E. Taylor, Kurt Drickamer. 2nd ed. **Oxford ; New York : Oxford University Press**, 2006.

HART, G.W.; HALTIWANGER R.S.; HOLT G.D.; KELLY W.G. Glycosylation in the nucleus and cytoplasm. **Annu Rev Biochem**, V. 58, p. 841-74, 1989.

HOLT, G.D.; HART G.W. The subcellular distribution of terminal N-acetylglucosamine moieties. Localization of a novel protein-saccharide linkage, O-linked GlcNAc. **J Biol Chem**, V. 261, p. 8049-57, 1986.

FULOP, N.; MARCHASE R.B.; CHATHAM J.C. Role of protein O-linked N-acetylglucosamine in mediating cell function and survival in the cardiovascular system. **Cardiovasc Res**, V. 73, p. 288-97, 2007.

LIMA, V.V.; GIACHINI F.R.; CARNEIRO F.S.; CARNEIRO Z.N.; FORTES Z.B.; CARVALHO M.H.C.; WEBB R.C.; TOSTES R.C. Increased vascular O-GlcNAcylation augments reactivity to constrictor stimuli. **JASH**, V. 2, p. 410-17, 2008.

LIMA VV; RIGSBY CS; HARDY DM; WEBB RC; RC. T. O-GlcNAcylation: a novel post-translational mechanism to alter vascular cellular signaling in health and disease: focus on hypertension. **Journal of the American Society of Hypertension**, V. 3, p. 374-87, 2009.

LACZY, B.; HILL B.G.; WANG K.; PATERSON A.J.; WHITE C.R.; XING D.; CHEN Y.F.; DARLEY-USMAR V.; OPARIL S.; CHATHAM J.C. Protein O-GlcNAcylation: a new signaling paradigm for the cardiovascular system. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, V. 296, p. H13-28, 2009.

TORRES, C.R.; HART G.W. Topography and polypeptide distribution of terminal N-acetylglucosamine residues on the surfaces of intact lymphocytes. Evidence for O-linked GlcNAc. **J Biol Chem**, V. 259, p. 3308-17, 1984.

LIMA, V.V.; GIACHINI F.R.; HARDY D.M.; WEBB R.C.; TOSTES R.C. O-GlcNAcylation: a novel pathway contributing to the effects of endothelin in the vasculature. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, V. 300, p. R236-50, 2011.

LIMA, V.V.; GIACHINI F.R.; CHOI H.; CARNEIRO F.S.; CARNEIRO Z.N.; FORTES Z.B.; CARVALHO M.H.; WEBB R.C.; TOSTES R.C. Impaired vasodilator activity in deoxycorticosterone acetate-salt hypertension is associated with increased protein O-GlcNAcylation. **Hypertension**, V. 53, p. 166-74, 2009.

WANG, J.; TORII M.; LIU H.; HART G.W.; HU Z.Z. dbOGAP - an integrated bioinformatics resource for protein O-GlcNAcylation. **BMC Bioinformatics**, V. 12, p. 91, 2011.

HU, Z.Z. dbOGAP: Database of O-GlcNAcylated Proteins and Sites. Washington DC 2010; Available from: <http://cbsb.lombardi.georgetown.edu/OGAP.html>.

HANOVER, J.A.; KRAUSE M.W.; LOVE D.C. The hexosamine signaling pathway: O-GlcNAc cycling in feast or famine. **Biochim Biophys Acta**, V. 1800, p. 80-95, 2010.

LOVE, D.C.; HANOVER J.A. The hexosamine signaling pathway: deciphering the "O-GlcNAc code". **Sci STKE**, V. 2005, p. re13, 2005.

ZACHARA, N.E.; HART G.W. Cell signaling, the essential role of O-GlcNAc! **Biochim Biophys Acta**, V. 1761, p. 599-617, 2006.

WELLS, L.; WHELAN S.A.; HART G.W. O-GlcNAc: a regulatory post-translational modification. **Biochem Biophys Res Commun**, V. 302, p. 435-41, 2003.

BUTKINAREE, C.; PARK K.; HART G.W. O-linked beta-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc): Extensive crosstalk with phosphorylation to regulate signaling and transcription in response to nutrients and stress. **Biochim Biophys Acta**, V. 1800, p. 96-106, 2009.

HU, P.; SHIMOJI S.; HART G.W. Site-specific interplay between O-GlcNAcylation and phosphorylation in cellular regulation. **FEBS Lett**, V. 584, p. 2526-38, 2010.

WANG, J.; LIU R.; HAWKINS M.; BARZILAI N.; ROSSETTI L. A nutrient-sensing pathway regulates leptin gene expression in muscle and fat. **Nature**, V. 393, p. 684-8, 1998.

CHATHAM, J.C.; NOT L.G.; FULOP N.; MARCHASE R.B. Hexosamine biosynthesis and protein O-glycosylation: the first line of defense against stress, ischemia, and trauma. **Shock**, V. 29, p. 431-40, 2008.

NGOH, G.A.; JONES S.P. New insights into metabolic signaling and cell survival: the role of beta-O-linkage of N-acetylglucosamine. **J Pharmacol Exp Ther**, V. 327, p. 602-9, 2008.

ZACHARA, N.E.; O'DONNELL N.; CHEUNG W.D.; MERCER J.J.; MARTH J.D.; HART G.W. Dynamic O-GlcNAc modification of nucleocytoplasmic proteins in response to stress. A survival response of mammalian cells. **J Biol Chem**, V. 279, p. 30133-42, 2004.

LUBAS, W.A.; HANOVER J.A. Functional expression of O-linked GlcNAc transferase. Domain structure and substrate specificity. **J Biol Chem**, V. 275, p. 10983-8, 2000.

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, p. 415-21, 2006.

KREPPEL, L.K.; HART G.W. Regulation of a cytosolic and nuclear O-GlcNAc transferase. Role of the tetratricopeptide repeats. **J Biol Chem**, V. 274, p. 32015-22, 1999.

IYER, S.P.; AKIMOTO Y.; HART G.W. Identification and cloning of a novel family of coiled-coil domain proteins that interact with O-GlcNAc transferase. **J Biol Chem**, V. 278, p. 5399-409, 2003.

WELLS, L.; KREPPEL L.K.; COMER F.I.; WADZINSKI B.E.; HART G.W. O-GlcNAc transferase is in a functional complex with protein phosphatase 1 catalytic subunits. **J Biol Chem**, V. 279, p. 38466-70, 2004.

DONG, D.L.; HART G.W. Purification and characterization of an O-GlcNAc selective N-acetyl-beta-D-glucosaminidase from rat spleen cytosol. **J Biol Chem**, V. 269, p. 19321-30, 1994.

MACAULEY, M.S.; WHITWORTH G.E.; DEBOWSKI A.W.; CHIN D.; VOCADLO D.J. O-GlcNAcase uses substrate-assisted catalysis: kinetic analysis and development of highly selective mechanism-inspired inhibitors. **J Biol Chem**, V. 280, p. 25313-22, 2005.

TOLEMAN, C.; PATERSON A.J.; WHISENHUNT T.R.; KUDLOW J.E. Characterization of the histone acetyltransferase (HAT) domain of a bifunctional protein with activable O-GlcNAcase and HAT activities. **J Biol Chem**, V. 279, p. 53665-73, 2004.

WELLS, L.; GAO Y.; MAHONEY J.A.; VOSSELLER K.; CHEN C.; ROSEN A.; HART G.W. Dynamic O-glycosylation of nuclear and cytosolic proteins: further characterization of the nucleocytoplasmic beta-N-acetylglucosaminidase, O-GlcNAcase. **J Biol Chem**, V. 277, p. 1755-61, 2002.

KIM, E.J.; AMORELLI B.; ABDO M.; THOMAS C.J.; LOVE D.C.; KNAPP S.; HANOVER J.A. Distinctive inhibition of O-GlcNAcase isoforms by an alpha-GlcNAc thiolsulfonate. **J Am Chem Soc**, V. 129, p. 14854-5, 2007.

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, p. 1279-91, 2002.

KAMEMURA, K.; HART G.W. Dynamic interplay between O-glycosylation and O-phosphorylation of nucleocytoplasmic proteins: a new paradigm for metabolic control of signal transduction and transcription. **Prog Nucleic Acid Res Mol Biol**, V. 73, p. 107-36, 2003.

COMER, F.I.; HART G.W. Reciprocity between O-GlcNAc and O-phosphate on the carboxyl terminal domain of RNA polymerase II. **Biochemistry**, V. 40, p. 7845-52, 2001.

GRIFFITH, L.S.; SCHMITZ B. O-linked N-acetylglucosamine levels in cerebellar neurons respond reciprocally to perturbations of phosphorylation. **Eur J Biochem**, V. 262, p. 824-31, 1999.

DU, X.L.; EDELSTEIN D.; DIMMELER S.; JU Q.; SUI C.; BROWNLEE M. Hyperglycemia inhibits endothelial nitric oxide synthase activity by posttranslational modification at the Akt site. **J Clin Invest**, V. 108, p. 1341-8, 2001.

MUSICKI, B.; KRAMER M.F.; BECKER R.E.; BURNETT A.L. Inactivation of phosphorylated endothelial nitric oxide synthase (Ser-1177) by O-GlcNAc in diabetes-associated erectile dysfunction. **Proc Natl Acad Sci U S A**, V. 102, p. 11870-5, 2005.

CHEN, L.; LIU Y.; CUI B.; MI Q.; HUANG Y.; FAN L.; CHEN Q.; TANG J.; FERRO A.; JI Y. 17Beta-oestradiol partially attenuates the inhibition of nitric oxide synthase-3 by advanced glycation end-products in human platelets. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, V. 34, p. 972-8, 2007.

HART, G.W.; GREIS K.D.; DONG L.Y.; BLOMBERG M.A.; CHOU T.Y.; JIANG M.S.; ROQUEMORE E.P.; SNOW D.M.; KREPPPEL L.K.; COLE R.N.; ET AL. O-linked N-acetylglucosamine: the "yin-yang" of Ser/Thr phosphorylation? Nuclear and cytoplasmic glycosylation. **Adv Exp Med Biol**, V. 376, p. 115-23, 1995.

YANG, W.H.; KIM J.E.; NAM H.W.; JU J.W.; KIM H.S.; KIM Y.S.; CHO J.W. Modification of p53 with O-linked N-acetylglucosamine regulates p53 activity and stability. **Nat Cell Biol**, V. 8, p. 1074-83, 2006.

WANG, Z.; PANDEY A.; HART G.W. Dynamic interplay between O-linked N-acetylglucosaminylation and glycogen synthase kinase-3-dependent phosphorylation. **Mol Cell Proteomics**, V. 6, p. 1365-79, 2007.

MISHRA, S.; ANDE S.R.; SALTER N.W. O-GlcNAc modification: why so intimately associated with phosphorylation? **Cell Commun Signal**, V. 9, p. 1, 2011.

VOSSELLER, K.; WELLS L.; LANE M.D.; HART G.W. Elevated nucleocytoplasmic glycosylation by O-GlcNAc results in insulin resistance associated with defects in Akt activation in 3T3-L1 adipocytes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, V. 99, p. 5313-8, 2002.

FEDERICI, M.; MENGHINI R.; MAURIELLO A.; HRIBAL M.L.; FERRELLI F.; LAURO D.; SBRACCIA P.; SPAGNOLI L.G.; SESTI G.; LAURO R. 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, p. 466-72, 2002.

COOKSEY, R.C.; MCCLAIN D.A. Transgenic mice overexpressing the rate-limiting enzyme for hexosamine synthesis in skeletal muscle or adipose tissue exhibit total body insulin resistance. **Ann N Y Acad Sci**, V. 967, p. 102-11, 2002.

HEBERT, L.F., JR.; DANIELS M.C.; ZHOU J.; CROOK E.D.; TURNER R.L.; SIMMONS S.T.; NEIDIGH J.L.; ZHU J.S.; BARON A.D.; MCCLAIN D.A. Overexpression of glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase in transgenic mice leads to insulin resistance. **J Clin Invest**, V. 98, p. 930-6, 1996.

VIRKAMAKI, A.; DANIELS M.C.; HAMALAINEN S.; UTRIAINEN T.; MCCLAIN D.; YKI-JARVINEN H. Activation of the hexosamine pathway by glucosamine in vivo induces insulin resistance in multiple insulin sensitive tissues. **Endocrinology**, V. 138, p. 2501-7, 1997.

VIRKAMAKI, A.; YKI-JARVINEN H. Allosteric regulation of glycogen synthase and hexokinase by glucosamine-6-phosphate during glucosamine-induced insulin resistance in skeletal muscle and heart. **Diabetes**, V. 48, p. 1101-7, 1999.

PATTI, M.E.; VIRKAMAKI A.; LANDAKER E.J.; KAHN C.R.; YKI-JARVINEN H. Activation of the hexosamine pathway by glucosamine in vivo induces insulin resistance of early postreceptor insulin signaling events in skeletal muscle. **Diabetes**, V. 48, p. 1562-71, 1999.

MARSHALL, S.; BACOTE V.; TRAXINGER R.R. Discovery of a metabolic pathway mediating glucose-induced desensitization of the glucose transport system. Role of hexosamine biosynthesis in the induction of insulin resistance. **J Biol Chem**, V. 266, p. 4706-12, 1991.

MCCLAIN, D.A.; LUBAS W.A.; COOKSEY R.C.; HAZEL M.; PARKER G.J.; LOVE D.C.; HANOVER J.A. Altered glycan-dependent signaling induces insulin resistance and hyperleptinemia. **Proc Natl Acad Sci U S A**, V. 99, p. 10695-9, 2002.

PARKER, G.; TAYLOR R.; JONES D.; MCCLAIN D. Hyperglycemia and inhibition of glycogen synthase in streptozotocin-treated mice: role of O-linked N-acetylglucosamine. **J Biol Chem**, V. 279, p. 20636-42, 2004.

LEHMAN, D.M.; FU D.J.; FREEMAN A.B.; HUNT K.J.; LEACH R.J.; JOHNSON-PAIS T.; HAMLINGTON J.; DYER T.D.; ARYA R.; ABOUD H.; GORING H.H.; DUGGIRALA R.; BLANGERO J.; KONRAD R.J.; STERN M.P. 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, p. 1214-21, 2005.

REN, J.; DAVIDOFF A.J. Diabetes rapidly induces contractile dysfunctions in isolated ventricular myocytes. **Am J Physiol**, V. 272, p. H148-58, 1997.

DAVIDOFF, A.J.; REN J. Low insulin and high glucose induce abnormal relaxation in cultured adult rat ventricular myocytes. **Am J Physiol**, V. 272, p. H159-67, 1997.

DUTTA, K.; CARMODY M.W.; CALA S.E.; DAVIDOFF A.J. Depressed PKA activity contributes to impaired SERCA function and is linked to the pathogenesis of glucose-induced cardiomyopathy. **J Mol Cell Cardiol**, V. 34, p. 985-96, 2002.

REN, J.; GINTANT G.A.; MILLER R.E.; DAVIDOFF A.J. High extracellular glucose impairs cardiac E-C coupling in a glycosylation-dependent manner. **Am J Physiol**, V. 273, p. H2876-83, 1997.

HU, Y.; BELKE D.; SUAREZ J.; SWANSON E.; CLARK R.; HOSHIJIMA M.; DILLMANN W.H. Adenovirus-mediated overexpression of O-GlcNAcase improves contractile function in the diabetic heart. **Circ Res**, V. 96, p. 1006-13, 2005.

CLARK, R.J.; MCDONOUGH P.M.; SWANSON E.; TROST S.U.; SUZUKI M.; FUKUDA M.; DILLMANN W.H. Diabetes and the accompanying hyperglycemia impairs cardiomyocyte calcium cycling through increased nuclear O-GlcNAcylation. **J Biol Chem**, V. 278, p. 44230-7, 2003.

CHEUNG, W.D.; SAKABE K.; HOUSLEY M.P.; DIAS W.B.; HART G.W. O-linked beta-N-acetylglucosaminyltransferase substrate specificity is regulated by myosin phosphatase targeting and other interacting proteins. **J Biol Chem**, V. 283, p. 33935-41, 2008.

RIGSBY, C.S.; LIMA V.V.; WEBB R.C.; TOSTES R.C. Increased O-GlcNAcylation in Renal Arteries from Angiotensin II/Salt-Hypertensive Rats. **Hypertension**, V. 54, p. 154, 2009.

JAMES, L.R.; TANG D.; INGRAM A.; LY H.; THAI K.; CAI L.; SCHOLEY J.W. Flux through the hexosamine pathway is a determinant of nuclear factor kappaB-dependent promoter activation. **Diabetes**, V. 51, p. 1146-56, 2002.

KNEASS, Z.T.; MARCHASE R.B. Neutrophils exhibit rapid agonist-induced increases in protein-associated O-GlcNAc. **J Biol Chem**, V. 279, p. 45759-65, 2004.

XING, D.; FENG W.; NOT L.G.; MILLER A.P.; ZHANG Y.; CHEN Y.F.; MAJID-HASSAN E.; CHATHAM J.C.; OPARIL S. Increased protein O-GlcNAc modification inhibits inflammatory and neointimal responses to acute endoluminal arterial injury. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, V. 295, p. H335-42, 2008.

NGOH, G.A.; FACUNDO H.T.; ZAFIR A.; JONES S.P. O-GlcNAc signaling in the cardiovascular system. **Circ Res**, V. 107, p. 171-85, 2010.

JONES, S.P.; ZACHARA N.E.; NGOH G.A.; HILL B.G.; TESHIMA Y.; BHATNAGAR A.; HART G.W.; MARBAN E. Cardioprotection by N-acetylglucosamine linkage to cellular proteins. **Circulation**, V. 117, p. 1172-82, 2008.

YANG, S.; ZOU L.Y.; BOUNELIS P.; CHAUDRY I.; CHATHAM J.C.; MARCHASE R.B. Glucosamine administration during resuscitation improves organ function after trauma hemorrhage. **Shock**, V. 25, p. 600-7, 2006.

ZOU, L.; YANG S.; CHAMPATTANACHAI V.; HU S.; CHAUDRY I.H.; MARCHASE R.B.; CHATHAM J.C. Glucosamine improves cardiac function following trauma-hemorrhage by increased protein O-GlcNAcylation and attenuation of NF- κ B signaling. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, V. 296, p. H515-23, 2009.

NOT, L.G.; BROCKS C.A.; VAMHIDY L.; MARCHASE R.B.; CHATHAM J.C. Increased O-linked beta-N-acetylglucosamine levels on proteins improves survival, reduces inflammation and organ damage 24 hours after trauma-hemorrhage in rats. **Crit Care Med**, V. 38, p. 562-71, 2010.

ZACHARA, N.E.; HART G.W. O-GlcNAc a sensor of cellular state: the role of nucleocytoplasmic glycosylation in modulating cellular function in response to nutrition and stress. **Biochim Biophys Acta**, V. 1673, p. 13-28, 2004.

O'DONNELL, N.; ZACHARA N.E.; HART G.W.; MARTH J.D. Ogt-dependent X-chromosome-linked protein glycosylation is a requisite modification in somatic cell function and embryo viability. **Mol Cell Biol**, V. 24, p. 1680-90, 2004.

SHAFI, R.; IYER S.P.; ELLIES L.G.; O'DONNELL N.; MAREK K.W.; CHUI D.; HART G.W.; MARTH J.D. The O-GlcNAc transferase gene resides on the X chromosome and is essential for embryonic stem cell viability and mouse ontogeny. **Proc Natl Acad Sci U S A**, V. 97, p. 5735-9, 2000.

YANAGISAWA, M.; KURIHARA H.; KIMURA S.; TOMOBE Y.; KOBAYASHI M.; MITSUI Y.; YAZAKI Y.; GOTO K.; MASAKI T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. **Nature**, V. 332, p. 411-5, 1988.

INOUE, A.; YANAGISAWA M.; KIMURA S.; KASUYA Y.; MIYAUCHI T.; GOTO K.; MASAKI T. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, V. 86, p. 2863-7, 1989.

LEVIN, E.R. Endothelins. **N Engl J Med**, V. 333, p. 356-63, 1995.

GORACA, A. New views on the role of endothelin (minireview). **Endocr Regul**, V. 36, p. 161-7, 2002.

YANG, Z.H.; DIEDERICH D.; SCHNEIDER K.; SIEBENMANN R.; STULZ P.; VON SEGESSER L.; TURINA M.; BUHLER F.R.; LUSCHER T.F. Endothelium-derived relaxing factor and protection against contractions induced by histamine and serotonin in the human internal mammary artery and in the saphenous vein. **Circulation**, V. 80, p. 1041-8, 1989.

DAVENPORT, A.P.; MAGUIRE J.J. Endothelin. **Handb Exp Pharmacol**, p. 295-329, 2006.

GASIC, S.; WAGNER O.F.; VIERHAPPER H.; NOWOTNY P.; WALDHAUSL W. Regional hemodynamic effects and clearance of endothelin-1 in humans: renal and peripheral tissues may contribute to the overall disposal of the peptide. **J Cardiovasc Pharmacol**, V. 19, p. 176-80, 1992.

DUPUIS, J.; STEWART D.J.; CERNACEK P.; GOSSELIN G. Human pulmonary circulation is an important site for both clearance and production of endothelin-1. **Circulation**, V. 94, p. 1578-84, 1996.

GIACHINI, F.R.; CALLERA G.E.; CARNEIRO F.S.; TOSTES R.C.; WEBB R.C. Therapeutic targets in hypertension: is there a place for antagonists of the most potent vasoconstrictors? **Expert Opin Ther Targets**, V. 12, p. 327-39, 2008.

ARAI, H.; HORI S.; ARAMORI I.; OHKUBO H.; NAKANISHI S. Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. **Nature**, V. 348, p. 730-2, 1990.

DAVENPORT, A.P. International Union of Pharmacology. XXIX. Update on endothelin receptor nomenclature. **Pharmacol Rev**, V. 54, p. 219-26, 2002.

SAKURAI, T.; YANAGISAWA M.; TAKUWA Y.; MIYAZAKI H.; KIMURA S.; GOTO K.; MASAKI T. Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. **Nature**, V. 348, p. 732-5, 1990.

HAYNES, W.G.; WEBB D.J. The endothelin family of peptides: local hormones with diverse roles in health and disease? **Clin Sci (Lond)**, V. 84, p. 485-500, 1993.

DAVENPORT, A.P.; O'REILLY G.; MOLENAAR P.; MAGUIRE J.J.; KUC R.E.; SHARKEY A.; BACON C.R.; FERRO A. Human endothelin receptors characterized using reverse transcriptase-polymerase chain reaction, in situ hybridization, and subtype-selective ligands BQ123 and BQ3020: evidence for expression of ETB receptors in human vascular smooth muscle. **J Cardiovasc Pharmacol**, V. 22 Suppl 8, p. S22-5, 1993.

VERHAAR, M.C.; STRACHAN F.E.; NEWBY D.E.; CRUDEN N.L.; KOOMANS H.A.; RABELINK T.J.; WEBB D.J. Endothelin-A receptor antagonist-mediated vasodilatation is attenuated by inhibition of nitric oxide synthesis and by endothelin-B receptor blockade. **Circulation**, V. 97, p. 752-6, 1998.

ROBIN, P.; BOULVEN I.; DESMYTER C.; HARBON S.; LEIBER D. ET-1 stimulates ERK signaling pathway through sequential activation of PKC and Src in rat myometrial cells. **Am J Physiol Cell Physiol**, V. 283, p. C251-60, 2002.

NEYLON, C.B. Vascular biology of endothelin signal transduction. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, V. 26, p. 149-53, 1999.

IVEY, M.E.; OSMAN N.; LITTLE P.J. Endothelin-1 signalling in vascular smooth muscle: pathways controlling cellular functions associated with atherosclerosis. **Atherosclerosis**, V. 199, p. 237-47, 2008.

SMITH, L.; PAYNE J.A.; SEDEEK M.H.; GRANGER J.P.; KHALIL R.A. Endothelin-induced increases in Ca²⁺ entry mechanisms of vascular contraction are enhanced during high-salt diet. **Hypertension**, V. 41, p. 787-93, 2003.

CHEW, D.K.; ORSHAL J.M.; KHALIL R.A. Elastase-induced suppression of endothelin-mediated Ca²⁺ entry mechanisms of vascular contraction. **Hypertension**, V. 42, p. 818-24, 2003.

SOMLYO, A.P.; SOMLYO A.V. Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. **J Physiol**, V. 522 Pt 2, p. 177-85, 2000.

UEHATA, M.; ISHIZAKI T.; SATOH H.; ONO T.; KAWAHARA T.; MORISHITA T.; TAMAKAWA H.; YAMAGAMI K.; INUI J.; MAEKAWA M.; NARUMIYA S. Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. **Nature**, V. 389, p. 990-4, 1997.

HILGERS, R.H.; WEBB R.C. Molecular aspects of arterial smooth muscle contraction: focus on Rho. **Exp Biol Med (Maywood)**, V. 230, p. 829-35, 2005.

HARTSHORNE, D.J.; ITO M.; ERDODI F. Myosin light chain phosphatase: subunit composition, interactions and regulation. **J Muscle Res Cell Motil**, V. 19, p. 325-41, 1998.

GOHLA, A.; SCHULTZ G.; OFFERMANN S. Role for G(12)/G(13) in agonist-induced vascular smooth muscle cell contraction. **Circ Res**, V. 87, p. 221-7, 2000.

CHITALEY, K.; WEBER D.; WEBB R.C. RhoA/Rho-kinase, vascular changes, and hypertension. **Curr Hypertens Rep**, V. 3, p. 139-44, 2001.

MUKAI, Y. [Involvement of Rho-kinase in hypertensive vascular disease-a novel therapeutic target in hypertension]. **Fukuoka Igaku Zasshi**, V. 93, p. 129-34, 2002.

CALLERA, G.E.; TOUZY R.M.; TEIXEIRA S.A.; MUSCARA M.N.; CARVALHO M.H.; FORTES Z.B.; NIGRO D.; SCHIFFRIN E.L.; TOSTES R.C. ETA receptor blockade decreases vascular superoxide generation in DOCA-salt hypertension. **Hypertension**, V. 42, p. 811-7, 2003.

WEHRWEIN, E.A.; NORTHCOTT C.A.; LOBERG R.D.; WATTS S.W. Rho/Rho kinase and phosphoinositide 3-kinase are parallel pathways in the development of spontaneous arterial tone in deoxycorticosterone acetate-salt hypertension. **J Pharmacol Exp Ther**, V. 309, p. 1011-9, 2004.

CLARKE, C.J.; FORMAN S.; PRITCHETT J.; OHANIAN V.; OHANIAN J. Phospholipase C-delta1 modulates sustained contraction of rat mesenteric small arteries in response to noradrenaline, but not endothelin-1. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, V. 295, p. H826-34, 2008.

GIACHINI, F.R.; CHIAO C.W.; CARNEIRO F.S.; LIMA V.V.; CARNEIRO Z.N.; DORRANCE A.M.; TOSTES R.C.; WEBB R.C. Increased activation of stromal interaction molecule-1/Orai-1 in aorta from hypertensive rats: a novel insight into vascular dysfunction. **Hypertension**, V. 53, p. 409-16, 2009.

LIMA, V.V.; GIACHINI F.R.; CARNEIRO F.S.; CARNEIRO Z.N.; SALEH M.A.; POLLOCK D.M.; FORTES Z.B.; CARVALHO M.H.; ERGUL A.; WEBB R.C.; TOSTES R.C. O-GlcNAcylation contributes to augmented vascular reactivity induced by endothelin 1. **Hypertension**, V. 55, p. 180-8, 2010.

YOGI, A.; CALLERA G.E.; MONTEZANO A.C.; ARANHA A.B.; TOSTES R.C.; SCHIFFRIN E.L.; TOUZY R.M. Endothelin-1, but not Ang II, activates MAP kinases through c-Src independent Ras-Raf dependent pathways in vascular smooth muscle cells. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, V. 27, p. 1960-7, 2007.

SAKAI, H.; CHIBA Y.; MISAWA M. Role of Rho kinase in endothelin-1-induced phosphorylation of CPI-17 in rat bronchial smooth muscle. **Pulm Pharmacol Ther**, V. 20, p. 734-9, 2007.

AKIMOTO, Y.; KREPPEL L.K.; HIRANO H.; HART G.W. Hyperglycemia and the O-GlcNAc transferase in rat aortic smooth muscle cells: elevated expression and altered patterns of O-GlcNAcylation. **Arch Biochem Biophys**, V. 389, p. 166-75, 2001.

SCHIFFRIN, E.L. Vascular endothelin in hypertension. **Vascul Pharmacol**, V. 43, p. 19-29, 2005.

DHAUN, N.; GODDARD J.; KOHAN D.E.; POLLOCK D.M.; SCHIFFRIN E.L.; WEBB D.J. Role of endothelin-1 in clinical hypertension: 20 years on. **Hypertension**, V. 52, p. 452-9, 2008.

KOHAN, D.E. Endothelin-1 and hypertension: from bench to bedside. **Curr Hypertens Rep**, V. 10, p. 65-9, 2008.

HYNYNEN, M.M.; KHALIL R.A. The vascular endothelin system in hypertension-recent patents and discoveries. **Recent Pat Cardiovasc Drug Discov**, V. 1, p. 95-108, 2006.

SCHIFFRIN, E.L.; TOUYZ R.M. Vascular biology of endothelin. **J Cardiovasc Pharmacol**, V. 32 Suppl 3, p. S2-13, 1998.

TOSTES, R.C.; MUSCARA M.N. Endothelin receptor antagonists: another potential alternative for cardiovascular diseases. **Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord**, V. 5, p. 287-301, 2005.

WANG, Y.; WANG D.H. Prevention of endothelin-1-induced increases in blood pressure: role of endogenous CGRP. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, V. 287, p. H1868-74, 2004.

YANG, Z.H.; RICHARD V.; VON SEGESSER L.; BAUER E.; STULZ P.; TURINA M.; LUSCHER T.F. Threshold concentrations of endothelin-1 potentiate contractions to norepinephrine and serotonin in human arteries. A new mechanism of vasospasm? **Circulation**, V. 82, p. 188-95, 1990.

WHITE, D.G.; CANNON T.R.; GARRATT H.; MUNDIN J.W.; SUMNER M.J.; WATTS I.S. Endothelin ETA and ETB receptors mediate vascular smooth-muscle contraction. **J Cardiovasc Pharmacol**, V. 22 Suppl 8, p. S144-8, 1993.

YAZAWA, H.; IIDA-KUBOTA E.; HONMA Y.; HONDA K. Characterization of the endothelin receptor in primary cultures of human aortic smooth muscle cells. **Jpn J Pharmacol**, V. 63, p. 313-8, 1993.

BOUALLEGUE, A.; DAOU G.B.; SRIVASTAVA A.K. Endothelin-1-induced signaling pathways in vascular smooth muscle cells. **Curr Vasc Pharmacol**, V. 5, p. 45-52, 2007.

LIMA, V.V.; GIACHINI F.R.; WEBB R.C.; TOSTES R.C. ET-1-induced vascular contraction is mediated by RhoA/Rho-kinase pathway activation via O-GlcNAcylation. **FASEB J**, V. 23, p. 60312, 2010.

GOLKS, A.; TRAN T.T.; GOETSCHY J.F.; GUERINI D. Requirement for O-linked N-acetylglucosaminyltransferase in lymphocytes activation. **EMBO J**, V. 26, p. 4368-79, 2007.

GOLKS, A.; GUERINI D. The O-linked N-acetylglucosamine modification in cellular signalling and the immune system. 'Protein modifications: beyond the usual suspects' review series. **EMBO Rep**, V. 9, p. 748-53, 2008.

FULOP, N.; ZHANG Z.; MARCHASE R.B.; CHATHAM J.C. Glucosamine cardioprotection in perfused rat hearts associated with increased O-linked N-acetylglucosamine protein modification and altered p38 activation. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, V. 292, p. H2227-36, 2007.

MARSH, S.A.; CHATHAM J.C. The paradoxical world of protein O-GlcNAcylation: a novel effector of cardiovascular (dys)function. **Cardiovasc Res**, V. 89, p. 487-8, 2011.

FULOP, N.; MASON M.M.; DUTTA K.; WANG P.; DAVIDOFF A.J.; MARCHASE R.B.; CHATHAM J.C. Impact of Type 2 diabetes and aging on cardiomyocyte function and O-linked N-acetylglucosamine levels in the heart. **Am J Physiol Cell Physiol**, V. 292, p. C1370-8, 2007.

BIVALACQUA, T.J.; CHAMPION H.C.; USTA M.F.; CELLEK S.; CHITALEY K.; WEBB R.C.; LEWIS R.L.; MILLS T.M.; HELLSTROM W.J.; KADOWITZ P.J. RhoA/Rho-kinase suppresses endothelial nitric oxide synthase in the penis: a mechanism for diabetes-associated erectile dysfunction. **Proc Natl Acad Sci U S A**, V. 101, p. 9121-6, 2004.

CALO, L.A.; PESSINA A.C. RhoA/Rho-kinase pathway: much more than just a modulation of vascular tone. Evidence from studies in humans. **J Hypertens**, V. 25, p. 259-64, 2007.

SAUZEAU, V.; LE JEUNE H.; CARIO-TOUMANIANTZ C.; SMOLENSKI A.; LOHMANN S.M.; BERTOGLIO J.; CHARDIN P.; PACAUD P.; LOIRAND G. Cyclic GMP-dependent protein kinase signaling pathway inhibits RhoA-induced Ca²⁺ sensitization of contraction in vascular smooth muscle. **J Biol Chem**, V. 275, p. 21722-9, 2000.

CHITALEY, K.; WEBB R.C. Nitric oxide induces dilation of rat aorta via inhibition of rho-kinase signaling. **Hypertension**, V. 39, p. 438-42, 2002.

SAWADA, N.; ITOH H.; YAMASHITA J.; DOI K.; INOUE M.; MASATSUGU K.; FUKUNAGA Y.; SAKAGUCHI S.; SONE M.; YAMAHARA K.; YURUGI T.; NAKAO K. cGMP-dependent protein kinase phosphorylates and inactivates RhoA. **Biochem Biophys Res Commun**, V. 280, p. 798-805, 2001.

HEDOU, J.; CIENIEWSKI-BERNARD C.; LEROY Y.; MICHALSKI J.C.; MOUNIER Y.; BASTIDE B. O-linked N-acetylglucosaminylation is involved in the Ca²⁺ activation properties of rat skeletal muscle. **J Biol Chem**, V. 282, p. 10360-9, 2007.

CIENIEWSKI-BERNARD, C.; BASTIDE B.; LEFEBVRE T.; LEMOINE J.; MOUNIER Y.; MICHALSKI J.C. Identification of O-linked N-acetylglucosamine proteins in rat skeletal muscle using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. **Mol Cell Proteomics**, V. 3, p. 577-85, 2004.

HOMMA, N.; NAGAOKA T.; MORIO Y.; OTA H.; GEBB S.A.; KAROOR V.; MCMURTRY I.F.; OKA M. Endothelin-1 and serotonin are involved in activation of RhoA/Rho kinase signaling in the chronically hypoxic hypertensive rat pulmonary circulation. **J Cardiovasc Pharmacol**, V. 50, p. 697-702, 2007.

CHIBA, Y.; SAKAI H.; MISAWA M. Endothelin-1-induced translocation of RhoA is mediated by endothelin ET(A) receptors in rat bronchial smooth muscle. **Eur J Pharmacol**, V. 517, p. 182-5, 2005.

KIM DO, H.; SEOK Y.M.; KIM I.K.; LEE I.K.; JEONG S.Y.; JEOUNG N.H. Glucosamine increases vascular contraction through activation of RhoA/Rho kinase pathway in isolated rat aorta. **BMB Rep**, V. 44, p. 415-20, 2011.

SCHERER, E.Q.; HERZOG M.; WANGEMANN P. Endothelin-1-induced vasospasms of spiral modiolar artery are mediated by rho-kinase-induced Ca(2+) sensitization of contractile apparatus and reversed by calcitonin gene-related Peptide. **Stroke**, V. 33, p. 2965-71, 2002.

ALLAHDADI, K.J.; WALKER B.R.; KANAGY N.L. ROK contribution to endothelin-mediated contraction in aorta and mesenteric arteries following intermittent hypoxia/hypercapnia in rats. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, V. 293, p. H2911-8, 2007.

BUDZYN, K.; PAULL M.; MARLEY P.D.; SOBEY C.G. Segmental differences in the roles of rho-kinase and protein kinase C in mediating vasoconstriction. **J Pharmacol Exp Ther**, V. 317, p. 791-6, 2006.

WOODSOME, T.P.; ETO M.; EVERETT A.; BRAUTIGAN D.L.; KITAZAWA T. Expression of CPI-17 and myosin phosphatase correlates with Ca(2+) sensitivity of protein kinase C-induced contraction in rabbit smooth muscle. **J Physiol**, V. 535, p. 553-64, 2001.

ALLAHDADI, K.J.; DULING L.C.; WALKER B.R.; KANAGY N.L. Eucapnic intermittent hypoxia augments endothelin-1 vasoconstriction in rats: role of PKCdelta. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, V. 294, p. H920-7, 2008.

RAINBOW, R.D.; NORMAN R.I.; EVERITT D.E.; BRIGNELL J.L.; DAVIES N.W.; STANDEN N.B. Endothelin-I and angiotensin II inhibit arterial voltage-gated K⁺ channels through different protein kinase C isoenzymes. **Cardiovasc Res**, V. 83, p. 493-500, 2009.

CAIN, A.E.; TANNER D.M.; KHALIL R.A. Endothelin-1-induced enhancement of coronary smooth muscle contraction via MAPK-dependent and MAPK-independent [Ca(2+)](i) sensitization pathways. **Hypertension**, V. 39, p. 543-9, 2002.

NILSSON, D.; WACKENFORS A.; GUSTAFSSON L.; UGANDER M.; INGEMANSSON R.; EDVINSSON L.; MALMSJO M. PKC and MAPK signalling pathways regulate vascular endothelin receptor expression. **Eur J Pharmacol**, V. 580, p. 190-200, 2008.

SUD, N.; BLACK S.M. Endothelin-1 impairs nitric oxide signaling in endothelial cells through a protein kinase Cdelta-dependent activation of STAT3 and decreased endothelial nitric oxide synthase expression. **DNA Cell Biol**, V. 28, p. 543-53, 2009.

MATSUO, J.; OKU H.; KANBARA Y.; KOBAYASHI T.; SUGIYAMA T.; IKEDA T. Involvement of NADPH oxidase and protein kinase C in endothelin-1-induced superoxide production in retinal microvessels. **Exp Eye Res**, V. 89, p. 693-9, 2009.

HARDY, D.; TOSTES R.C.; WEBB R.C. O-GlcNacylation augments protein kinase C mediated vasoconstriction. **FASEB J**, p. 6038, 2010.

GALLANT, C.; YOU J.Y.; SASAKI Y.; GRABAREK Z.; MORGAN K.G. MARCKS is a major PKC-dependent regulator of calmodulin targeting in smooth muscle. **J Cell Sci**, V. 118, p. 3595-605, 2005.

PORUMB, T.; CRIVICI A.; BLACKSHEAR P.J.; IKURA M. Calcium binding and conformational properties of calmodulin complexed with peptides derived from myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS) and MARCKS-related protein (MRP). **Eur Biophys J**, V. 25, p. 239-47, 1997.

GRAFF, J.M.; YOUNG T.N.; JOHNSON J.D.; BLACKSHEAR P.J. Phosphorylation-regulated calmodulin binding to a prominent cellular substrate for protein kinase C. **J Biol Chem**, V. 264, p. 21818-23, 1989.

HARTWIG, J.H.; THELEN M.; ROSEN A.; JANMEY P.A.; NAIRN A.C.; ADEREM A. MARCKS is an actin filament crosslinking protein regulated by protein kinase C and calcium-calmodulin. **Nature**, V. 356, p. 618-22, 1992.

SALAMANCA, D.A.; KHALIL R.A. Protein kinase C isoforms as specific targets for modulation of vascular smooth muscle function in hypertension. **Biochem Pharmacol**, V. 70, p. 1537-47, 2005.

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, p. 13793-8, 2008.

ANEXOS

Anexo A

DECLARAÇÕES DO COMITÊ DE ÉTICA E EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

<p>UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS</p> <p>Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – Cep. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091-7438 e-mail: cep@icb.usp.br</p> <p>COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAL</p>
---	--

Decl. CEUA.012.10

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 007/04/CEUA, datado de 20.04.04 e por solicitação da Profa. Dra. Zuleica Bruno Fortes, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão dos alunos *Eveline Aparecida Isquierdo Fonseca, Victor Vitorino Lima, Graziela Neves Hagihara* ao projeto de pesquisa "*Reatividade microcirculatória em patologias experimentais: Papel do endotélio*", uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao referido certificado.

São Paulo, 31 de março de 2010.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador -CEUA- ICB/USP

**Georgia Health
Sciences University**

R. Clinton Webb, Ph.D.
Department of Physiology
Telephone: 706-721-7742
Facsimile: 706-721-7299
Email: cwebb@georgiahealth.edu

October 10, 2011.

To Whom It May Concern,

Victor Vitorino Lima, PhD student from Department of Pharmacology - Medical School of Ribeirao Preto - University of Sao Paulo, was employed as a Research Assistant at the Medical College of Georgia (MCG) in the Department of Physiology. During his employment he completed research experiments that supported his thesis "*O-GlcNAcylation contributes to the vascular effects of ET-1 via activation of RhoA/Rho-kinase pathway.*" In order to perform functions in my lab, as well as in Dr. Rita Tostes' lab, and work with animal models he had to complete MCG's Safety Program and all compliance training. Upon completion of training, Mr. Lima was included in the laboratory's animal protocol, AUP# 09-01-152. Please do not hesitate to contact me if you have questions, 706-721-7742.

Sincerely,

R. Clinton Webb, Ph.D.

Herbert S. Kupperman Chair in Cardiovascular Disease

Professor and Chairperson

Anexo B

Artigos publicados:

1- Lima VV, Giachini FR, Carneiro FS, Carneiro ZN, Saleh MA, Pollock DM, Fortes ZB, Carvalho MH, Ergul A, Webb RC, Tostes RC. O-GlcNAcylation contributes to augmented vascular reactivity induced by endothelin 1. **Hypertension**. 2010 Jan;55(1):180-8.

2- Lima VV, Giachini FR, Carneiro FS, Carvalho MH, Fortes ZB, Webb RC, Tostes RC. O-GlcNAcylation contributes to the vascular effects of ET-1 via activation of the RhoA/Rho-kinase pathway. **Cardiovasc Res**. 2011 Feb 15;89(3):614-22.

Hypertension

JOURNAL OF THE AMERICAN HEART ASSOCIATION

Learn and Live SM

O-GlcNAcylation Contributes to Augmented Vascular Reactivity Induced by Endothelin 1

Victor V. Lima, Fernanda R. Giachini, Fernando S. Carneiro, Zidonia N. Carneiro, Mohamed A. Saleh, David M. Pollock, Zuleica B. Fortes, Maria Helena C. Carvalho, Adviye Ergul, R. Clinton Webb and Rita C. Tostes

Hypertension 2010, 55:180-188: originally published online November 30, 2009
doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.143818

Hypertension is published by the American Heart Association, 7272 Greenville Avenue, Dallas, TX 75214

Copyright © 2009 American Heart Association. All rights reserved. Print ISSN: 0194-911X. Online ISSN: 1524-4563

The online version of this article, along with updated information and services, is located on the World Wide Web at:

<http://hyper.ahajournals.org/content/55/1/180>

Subscriptions: Information about subscribing to *Hypertension* is online at
<http://hyper.ahajournals.org/subscriptions/>

Permissions: Permissions & Rights Desk, Lippincott Williams & Wilkins, a division of Wolters Kluwer Health, 351 West Camden Street, Baltimore, MD 21202-2436. Phone: 410-528-4050. Fax: 410-528-8550. E-mail:
journalpermissions@lww.com

Reprints: Information about reprints can be found online at
<http://www.lww.com/reprints>

O-GlcNAcylation Contributes to Augmented Vascular Reactivity Induced by Endothelin 1

Victor V. Lima, Fernanda R. Giachini, Fernando S. Carneiro, Zidonia N. Carneiro, Mohamed A. Saleh, David M. Pollock, Zuleica B. Fortes, Maria Helena C. Carvalho, Adviye Ergul, R. Clinton Webb, Rita C. Tostes

Abstract—O-GlcNAcylation augments vascular contractile responses, and O-GlcNAc-proteins are increased in the vasculature of deoxycorticosterone-acetate salt rats. Because endothelin 1 (ET-1) plays a major role in vascular dysfunction associated with salt-sensitive forms of hypertension, we hypothesized that ET-1-induced changes in vascular contractile responses are mediated by O-GlcNAc modification of proteins. Incubation of rat aortas with ET-1 (0.1 $\mu\text{mol/L}$) produced a time-dependent increase in O-GlcNAc levels and decreased expression of O-GlcNAc transferase and β -N-acetylglucosaminidase, key enzymes in the O-GlcNAcylation process. Overnight treatment of aortas with ET-1 increased phenylephrine vasoconstriction (maximal effect [in moles]: 19 ± 5 versus 11 ± 2 vehicle). ET-1 effects were not observed when vessels were previously instilled with anti-O-GlcNAc transferase antibody or after incubation with an O-GlcNAc transferase inhibitor (3-[2-adamantanylethyl]-2-[[4-chlorophenyl]azamethylene]-4-oxo-1,3-thiazaperhydrazone-6-carboxylic acid; 100 $\mu\text{mol/L}$). Aortas from deoxycorticosterone-acetate salt rats, which exhibit increased prepro-ET-1, displayed increased contractions to phenylephrine and augmented levels of O-GlcNAc proteins. Treatment of deoxycorticosterone-acetate salt rats with an endothelin A antagonist abrogated augmented vascular levels of O-GlcNAc and prevented increased phenylephrine vasoconstriction. Aortas from rats chronically infused with low doses of ET-1 (2 pmol/kg per minute) exhibited increased O-GlcNAc proteins and enhanced phenylephrine responses (maximal effect [in moles]: 18 ± 2 versus 10 ± 3 control). These changes are similar to those induced by O-(2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranosylidene) amino-N-phenylcarbamate, an inhibitor of β -N-acetylglucosaminidase. Systolic blood pressure (in millimeters of mercury) was similar between control and ET-1-infused rats (117 ± 3 versus 123 ± 4 mm Hg; respectively). We conclude that ET-1 indeed augments O-GlcNAc levels and that this modification contributes to the vascular changes induced by this peptide. Increased vascular O-GlcNAcylation by ET-1 may represent a mechanism for hypertension-associated vascular dysfunction or other pathological conditions associated with increased levels of ET-1. (*Hypertension*. 2010;55:180-188.)

Key Words: β -N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) ■ endothelin 1 ■ vascular reactivity
■ β -N-acetylglucosaminidase ■ hypertension

O-Linked attachment of β -N-acetyl-glucosamine (O-GlcNAc) on serine and threonine residues of nuclear and cytoplasmic proteins is a highly dynamic and ubiquitous posttranslational modification that plays a key role in altering the function, activity, subcellular localization, and stability of target proteins.^{1–3} The attachment of a single O-GlcNAc is catalyzed by the enzyme O-GlcNAc transferase (OGT; uridine diphospho-N-acetylglucosamine:polypeptide β -N-acetylglucosaminyltransferase; UDP-NAC transferase), and the hydrolytic cleavage of O-GlcNAc is catalyzed by β -N-acetylglucosaminidase (OGA).³

Although it is clear that O-GlcNAcylation plays a critical role in the regulation of cell function, there is a paucity of

information on the vascular effects of O-GlcNAcylation. Preliminary evidence from our laboratory suggests that augmented vascular O-GlcNAc proteins increase reactivity to constrictor stimuli. Accordingly, incubation of arterial segments with O-(2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranosylidene) amino-N-phenylcarbamate (PugNAc), which blocks OGA activity by mimicking the enzyme-stabilized transition state,^{4,5} leads to increased reactivity to phenylephrine and serotonin.⁶

In addition, the vascular content of O-GlcNAc proteins is augmented in arteries from deoxycorticosterone acetate (DOCA) salt rats, a mineralocorticoid model of hypertension. Interestingly, increased levels of O-GlcNAc (induced by

Received September 21, 2009; first decision October 21, 2009; revision accepted November 3, 2009.

From the Department of Physiology (V.V.L., F.R.G., F.S.C., Z.N.C., A.E., R.C.W., R.C.T.) and Vascular Biology Center (M.A.S., D.M.P.), Medical College of Georgia, Augusta, Ga; Department of Pharmacology (F.S.C., Z.B.F., M.H.C.C., R.C.T.), Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil.

Correspondence to Victor V. Lima, Medical College of Georgia, Department of Physiology, 1120 Fifteenth St, CA-3141, Augusta, GA 30912-3000. E-mail vlima@mcg.edu

© 2009 American Heart Association, Inc.

Hypertension is available at <http://hyper.ahajournals.org>

DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.143818

PugNAc treatment) leads to changes in mechanisms that are commonly observed in hypertensive animals, such as decreased production of NO as a consequence of decreased activity of endothelial NO synthase,⁷ suggesting that augmented O-GlcNAc may contribute to abnormal vascular reactivity in mineralocorticoid hypertension.⁸

ET-1 is the most abundant and important peptide from the endothelin family. Its production is increased in the vasculature of salt-sensitive forms of hypertension, including DOCA-salt hypertensive rats.^{9–11} ET-1 not only induces vasoconstriction, but it also activates transcriptional factors responsible for the coordinated increase in many cytokines and enzymes, thus enhancing inflammation, oxidative stress, and tissue damage,^{9,10} which are all important in hypertension-associated vascular dysfunction.

In the present study, we hypothesized that ET-1 augments vascular contractile responses via increased O-GlcNAc modification of proteins. To address our hypothesis, we determined whether ET-1–induced augmented vascular reactivity can be modified by inhibition of the O-GlcNAc pathway. The effects of ET-1 on vascular function and O-GlcNAc levels were determined *in vitro* and *in vivo*, and the contribution of O-GlcNAc to ET-1 effects was assessed by pharmacological and molecular inhibition of the O-GlcNAc pathway.

Methods

Animals

Male Wistar rats (8 to 10 weeks old, 230 to 250 g; Harlan Laboratories, Indianapolis, IN) were used in this study. All of the procedures were performed in accordance with the Guiding Principles in the Care and Use of Animals, approved by the Medical College of Georgia Committee on the Use of Animals in Research and Education. The animals were housed on a 12-hour light/dark cycle and fed a standard chow diet with water *ad libitum*.

ET-1 Incubation Procedures

After euthanasia, thoracic aortas were removed and cleaned from fat tissue in an ice-cold physiological salt solution. Arterial segments were incubated in the Eagle minimum essential medium containing L-glutamine (1.0%), FBS (10.0%), penicillin (0.5%), and streptomycin (0.5%). Rings were incubated with either vehicle (H₂O) or ET-1 (0.1 μ mol/L) for 1, 3, 6, 12, or 24 hours to verify the optimal time point of induction of O-GlcNAc proteins, as well as changes in the expression of OGT and OGA. In other experiments, incubations were performed for 24 hours with the following: vehicle (H₂O), PugNAc (100.0 μ mol/L), or ET-1 (0.1 μ mol/L). In some experiments, arteries were pretreated (3 hours) with an OGT inhibitor (3-[2-adamantanylethyl]-2-[[4-chlorophenyl]azamethylene]-4-oxo-1,3-thiazaperhydrazone-6-carboxylic acid; 100 μ mol/L), an endothelin A (ET_A) antagonist (atrasentan, 1 μ mol/L) or neutralizing antibody against OGT (as described below). After the 3 hours, aortas were simultaneously incubated with ET-1 plus the OGT inhibitor, the ET_A antagonist, or the neutralizing antibody against OGT, for 24 hours. After incubation, aortas were used to evaluate vascular function or protein expression.

Antibody Delivery by the Chariot Technique

Antibodies against OGT (Santa Cruz Biotechnology) were intracellularly delivered by the Chariot technique (Chariot Protein Delivery Reagent, Active Motif). This transfection reagent is able to deliver antibodies into cells while preserving their ability to localize to the proper cellular compartment and to recognize antigens within the cell^{12–14} and in our experiments was used to directly inhibit OGT protein. Chariot/antibody complexes were prepared and used accord-

ing to the manufacturer's instructions. Briefly, aortic rings were incubated in Eagle minimum essential medium containing L-glutamine (1.0%), FBS (10.0%), and penicillin and streptomycin (0.5%) for 30 minutes at 37°C. For each transfection, 12 μ L of Chariot in 100 μ L of 40% dimethyl sulfoxide were mixed with 6 μ g of antibody in 100 μ L of PBS and incubated at room temperature for 30 minutes to allow the complex to form. The aortas were transferred to a sterile 24-well cell culture plate, overlaid with 200 μ L of Chariot/antibody complex, and mixed gently. Eagle minimum essential medium (400 μ L) was added, and the tissues were incubated for 1 hour at 37°C. Then, additional Eagle minimum essential medium (750 μ L) was added, and tissues were further incubated for 2 hours at 37°C. After this period, rings were mounted in the myograph, and functional studies were performed.

Infusion of Low Doses of ET-1

Rats were anesthetized with 5% isoflurane in 100% O₂ and maintained during surgery with 1.9% to 2.1% isoflurane in 100% O₂ through a nose cone. The depth of anesthesia was verified by noting the absence of physical responses to firm paw pinch and corneal probing. Osmotic minipumps (ALZET Osmotic Pumps) were implanted SC to deliver ET-1 (2 pmol/kg per minute; Phoenix Pharmaceuticals) or sodium chloride (0.9%) through a catheter in the jugular vein for 14 days. Aortas from ET-1–infused or control rats were freshly removed to evaluate vascular function or protein expression.

DOCA-Salt Hypertension

DOCA-salt hypertension was induced as described previously.¹⁵ Briefly, rats were unilaterally nephrectomized (Uni), and DOCA (200 mg/kg) silastic pellets were implanted SC in the scapular region. DOCA rats received water containing 1.0% NaCl and 0.2% KCl for 5 weeks. Control rats were also uninephrectomized and received silastic pellets without DOCA and tap water. Animals simultaneously received either the ET_A antagonist atrasentan (5 mg/d per kilogram of body weight, PO per gavage) or vehicle for 5 weeks. Aortas from DOCA-salt, treated, or those not treated with ET_A antagonist, as well as Uni, rats were freshly removed to evaluate vascular function or protein expression.

Systolic Blood Pressure Measurements

Systolic blood pressure was measured in nonanesthetized animals by tail cuff using an RTBP1001 rat-tail blood pressure system (Kent Scientific Corporation).

Euglycemic-Hyperinsulinemic Clamp

Rats were fasted overnight before being anesthetized and evaluated for insulin sensitivity using the euglycemic-hyperinsulinemic clamp method.¹⁶ Catheters were placed in the femoral artery for blood sampling and femoral and jugular veins for infusion of insulin and glucose. Blood samples were obtained at 5-minute intervals (Novolin; 30 mU/kg per minute; Novo Nordisk Pharmaceuticals). Glucose infusion (100 mg/mL of glucose in saline) was adjusted to maintain a plasma glucose level at 125 mg/dL within 60 minutes and maintained for an additional 30 minutes. The final 7 readings were averaged and reported as the glucose infusion rate (in milligrams per kilogram per minute).

Vascular Functional Studies

In 1 set of experiments, aortas were functionally evaluated after incubation with ET-1 for 24 hours, with or without treatments, as described previously. In another set of experiments, vascular function was accessed in aortas freshly harvested from ET-1–infused rats (14 days) or DOCA-salt rats. In this case, after euthanasia, thoracic aortas were removed and cleaned from fat tissue in an ice-cold physiological salt solution. Aortic rings (4 mm in length) were mounted between 2 stainless-steel wires in standard organ chambers (model 610M, Danish MyoTech) for isometric tension recording, as described previously.¹⁷ After stabilization, arterial integrity was assessed first by stimulation of vessels with 120 mmol/L of potas-

sium chloride (KCl) and, after washing and a new stabilization period, the presence of the endothelium was verified by contracting the segments with phenylephrine (PE; 1 $\mu\text{mol/L}$) followed by stimulation with acetylcholine (10 $\mu\text{mol/L}$). Concentration-response curves to PE (1 nM to 100 μM) and serotonin (5-hydroxytryptamine; 1 nM to 100 μM) were performed, and responses are represented as the percentage of KCl-induced contraction.

Western Blot Analysis

Proteins (60 μg) extracted from endothelium-intact aortas were separated by electrophoresis, and Western blots were performed as described previously.¹⁰ Antibodies used were anti-O-GlcNAc antibody, CTD 110.6 (1:2000; Pierce Biotechnology), OGT (1:400, Santa Cruz Biotechnology antibodies), and OGA antibody, which was kindly provided by Dr Sidney Whiteheart (1:1000, University of Kentucky). OGA is a 106-kDa heterodimer complex containing a 54-kDa α -subunit and a 51-kDa β -subunit.¹⁸

Aortas from 3 different experimental conditions (incubated with ET-1, from ET-infused rats, and from DOCA-salt rats) were used to perform Western blots experiments. Analyses of the bands were performed with software (Un-ScanIT Gel 6.1) that evaluates the density profile extraction and band analysis for entire lanes. The result of the sum of the bands was normalized by β -actin and expressed as arbitrary units.

Real-Time RT-PCR for Prepro-ET-1

Gene expression of prepro-ET-1 was determined as described previously.¹¹ Briefly, total RNA was extracted using the RNeasy kit (Qiagen Sciences), and 1 μg of total RNA was reverse transcribed in a final volume of 50 μL using the high-capacity cDNA archive kit (Applied Biosystems). Primers for prepro-ET-1 (No. Rn00561129_m1) mRNA were obtained from Applied Biosystems. Real-time RT-PCR (quantitative PCR) reactions were performed using the 7500 fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems) in a total volume of 20-mL reaction mixture following the manufacturer's protocol, using the TaqMan fast universal PCR master mix (Applied Biosystems) and 0.1 mmol/L of each primer. Relative gene expression for prepro-ET-1 mRNA was normalized to samples from Uni rats (calibrator), and results were calculated with the $\Delta\Delta\text{Ct}$ method and expressed as n -fold differences in prepro-ET-1 gene expression relative to 18S rRNA and to the calibrator.

Data Analysis

The results are shown as mean $\pm$ SEM, and "n" represents the number of animals used in the experiments. Contractions were recorded as changes in the displacement (in moles) from baseline. Relaxation is expressed as the percentage of change from the PE-contracted levels. Concentration-response curves were fitted using a nonlinear interactive fitting program (Graph Pad Prism 4.0; GraphPad Software Inc), and 2 pharmacological parameters were obtained: the maximal effect generated by the agonist (or E_{max}) and the negative logarithm of the concentration of agonist that produces 50% of the maximum response ($-\log \text{EC}_{50}$ [or pD_2]). Statistical analyses of E_{max} and pD_2 values were performed using 1-way ANOVA or Student t test. Post hoc comparisons were performed using the Newman-Keuls test. Western blot data were analyzed by 1-sample t test, and the P value was computed from the t ratio and the numbers of degrees of freedom. Values of $P < 0.05$ were considered statistically significant.

Results

The incubation of aortas with ET-1 (0.1 $\mu\text{mol/L}$) produced a time-dependent increase in vascular O-GlcNAc levels (Figure 1A). No differences on the O-GlcNAc levels were observed between aortas freshly harvested or after 24-hour incubation with vehicle. An inverse temporal correlation was observed for OGT (Figure 1B) and OGA (Figure 1C) expression.

After 24 hours of treatment with ET-1, arteries from Wistar rats displayed increased vascular reactivity to the α 1-

adrenergic agonist PE, and developed force levels were similar to those exhibited by aortas incubated with PugNAc, an inhibitor of OGA (Figure 2A and Table 1). No differences in KCl-induced contraction were observed among the groups (E_{max} [in moles]: 22.6 ± 1.9 vehicle, 22.8 ± 1.8 ET-1, and 21.67 ± 1.6 PugNAc). In addition, differences in PE-induced contraction, after ET-1 incubation for 24 hours, persisted in arteries without endothelium (E_{max} [in percentage of KCl]: 117.1 ± 4.8 vehicle versus 174.6 ± 11 ET-1).

Serotonin-induced contraction was increased in aortas after ET-1 incubation (Figure 2B), when compared with control arteries (pD_2 : 6.3 ± 0.1 vehicle versus 6.9 ± 0.1 ET-1; E_{max} [percentage of KCl]: 79.0 ± 7 vehicle versus 101 ± 1 ET-1; $n=5$), showing that O-GlcNAcylation does not interfere specifically with α 1-adrenergic-mediated responses. In vivo ET-1 infusion in Wistar rats for 14 days enhanced aortic contractile responses to PE in comparison with their respective controls (Figure 2C and Table 1). No differences in KCl-induced contraction were observed among the groups (E_{max} [in moles]: 22.7 ± 2 control versus 25 ± 1 ET-1). In addition, ET-1 infusion in Wistar rats augmented O-GlcNAc levels of vascular proteins (Figure 3A). ET-1 infusion for 2 weeks did not change vascular OGT expression (Figure 3B) but decreased OGA expression (Figure 3C). Systolic blood pressure was similar between control and ET-1-infused rats (117 ± 3 versus 123 ± 4 mm Hg, respectively; $n=5$; Table 2). ET-1 had no effect on fasting glucose levels (99.7 ± 2 versus 102 ± 7.4 mg/dL in control and ET-1 infusion, respectively) or body weight (Table 2). In addition, the euglycemic-hyperinsulinemic clamp test demonstrated that ET-1 had no effect on insulin sensitivity; glucose infusion rate was 6.0 ± 0.6 and 6.8 ± 0.6 mg/kg per minute in control ($n=4$) and ET-1-infused ($n=3$) rats, respectively.

The selective inhibition of OGT, with 3-(2-adamantanylethyl)-2-([4-chlorophenyl]azamethylene)-4-oxo-1,3-thiazaperhydroine-6-carboxylic acid (3-[2-adamantanylethyl]-2-([4-chlorophenyl]azamethylene)-4-oxo-1,3-thiazaperhydroine-6-carboxylic acid (TimTec LLC),¹⁹ resulted in decreased vascular O-GlcNAc levels (Figure 4A) and also attenuated the effects of ET-1 on vascular reactivity (Figure 4B). As shown in Figure 4, the effects of ET-1 on O-GlcNAc protein levels and vascular reactivity were not observed when vessels were instilled previously with antibodies against OGT (Figure 4C and 4D, respectively), intracellularly delivered by a transfection system (ActiveMotif USA). Incubation with an IgG antirabbit antibody was used as an additional control and did not modify ET-1-induced effects (data not shown).

We sought to determine whether ET-1 activation is a key element for increased vascular O-GlcNAc protein levels and, consequently, increased vascular reactivity in mineralocorticoid hypertension. To address this question, we used a pharmacological approach: treatment of DOCA-salt rats with an ET_A receptor antagonist (atrasentan; 5 mg $\cdot$ kg⁻¹ $\cdot$ d⁻¹). At 5 weeks of treatment, systolic blood pressure was higher in DOCA-salt rats in comparison with Uni rats (Uni: 124.9 ± 3.6 mm Hg versus DOCA: 163.6 ± 6.4 mm Hg; $n=6$; Table 2). DOCA-salt rats exhibited decreased body weight in comparison with Uni (Table 2). Prepro-ET-1 gene expression was augmented in aortas from DOCA-salt rats (fold of

Figure 1. ET-1 incubation at different time points produces a time-dependent increase in vascular O-GlcNAc levels and decreases OGT and OGA expression in the rat aorta. Aortas were incubated with ET-1 (0.1 μ mol/L) for 1, 3, 6, 12, or 24 hours, and Western blots were performed to evaluate O-GlcNAc proteins, as well as OGT and OGA expression. Top, Representative Western blot images of (A) O-GlcNAc-proteins, (B) OGT, and (C) OGA. Bottom, Corresponding bar graphs showing the relative expression of O-GlcNAc, OGT, and OGA after normalization to β -actin expression. Results are presented as mean $\pm$ SEM for $n=4$ in each experimental group. * $P<0.05$ vs vehicle (H_2O).

change: 2.1 ± 0.4 versus 1 control), and ET_A blockade with atrasentan did not prevent increased prepro-ET-1 mRNA expression (fold of change: 1.8 ± 0.1), as determined by quantitative PCR. Treatment with atrasentan attenuated, but did not normalize, blood pressure in DOCA-salt rats (137.5 ± 5.74 mm Hg; $n=6$; Table 2) and did not change body

weight in DOCA-salt animals (Table 2). On the other hand, the ET_A antagonist abrogated augmented vascular levels of O-GlcNAc in DOCA-salt rats (Figure 5A) and also prevented increased contractile responses to PE in aorta from these animals (Figure 5B). These results suggest that ET_A receptor activation plays a role in ET-1-induced vascular effects. They

Figure 2. ET-1 augments PE-induced vasoconstriction. ET-1 or PugNAc incubation for 24 hours increases vascular contraction to (A) PE and (B) 5-hydroxytryptamine (5-HT) in the thoracic rat aorta vs vehicle (methanol; $n=5$). ET-1 infusion for 14 days increases (C) PE-induced in arteries from Wistar rats ($n=5$). Experimental values of contraction were calculated relative to the contractile response produced by 120 mmol/L of KCl, which was taken as 100%. Results are presented as mean $\pm$ SEM in each experimental group. * $P<0.05$ vs vehicle (H_2O) or control.

are further reinforced by in vitro experiments, where atrasentan (1 μ mol/L) attenuated the effects of ET-1 incubation on O-GlcNAc protein levels and vascular reactivity (Figure 5C and 5D, respectively).

Discussion

O-GlcNAc has important implications for the regulation of protein structure and function and the interplay with other posttranslational modifications, such as phosphorylation.^{4,20,21} However, with respect to vascular function, O-GlcNAc is a relatively unexplored area. Our preliminary studies showed that O-GlcNAc is increased in the vasculature from DOCA-salt hypertensive rats.⁸ Considering that ET-1, which is increased in

Table 1. E_{max} and pD_2 Values for Phenylephrine in Arteries From Rats Incubated With ET-1 or From Rats Infused With ET-1

Incubation (24 h)	Phenylephrine	
	E_{max}	pD_2
Vehicle	69 $\pm$ 6	6.5 $\pm$ 0.1
PugNAc	115 $\pm$ 5*	6.7 $\pm$ 0.06
ET-1	107 $\pm$ 5*	7.1 $\pm$ 0.1*
Infusion (14 d)		
Control	77 $\pm$ 5	7.4 $\pm$ 0.06
ET-1 infusion	103 $\pm$ 3*	6.9 $\pm$ 0.06*

Values are mean $\pm$ SEM for $N=6$ experiments in each group. Contractile response to PE are represented as the percentage of KCl-induced contraction.

* $P<0.05$ vs vehicle or control.

this model of salt-dependent hypertension,^{9,10} contributes to vascular dysfunction in arteries from DOCA-salt rats, we sought to investigate whether O-GlcNAc underlies effects of ET-1 on vascular function.

Our data show for the first time that ET-1 augments vascular O-GlcNAcylation and that this posttranslational modification contributes to the vascular changes produced by this peptide. O-GlcNAcylation of nuclear and cytoplasmic proteins is regulated by OGT and OGA. We demonstrated that ET-1 produces a time-dependent and transient decrease in OGT vascular expression. Interestingly, PugNAc incubation for 24 hours, which increases vascular content of O-GlcNAc proteins in arteries from control animals,^{6,22} also decreases OGT expression.⁶ Decreased OGT may represent a compensatory mechanism for the augmented vascular levels of O-GlcNAc proteins. On the other hand, aortas from rats chronically infused with low doses of ET-1, which exhibit increased O-GlcNAc proteins, did not exhibit changes in vascular OGT expression at 14 days. This may be related to the transient changes in OGT expression produced by ET-1. A possible explanation is that OGT expression was measured at a time point (after 14 days) where expression has already returned to basal levels (as is the case for OGT expression after 24-hour incubation with ET-1 in vitro).

OGA expression was also decreased after treatment with ET-1, similarly to what has been demonstrated in aortas incubated with PugNAc.⁶ In addition, ET-1 infusion for 14 days decreased OGA expression in thoracic aortas. Increased vascular O-GlcNAcylation on in vivo and in vitro treatment with ET-1 may be mediated by decreased OGA expression or activity.

To clarify whether ET-1-induced augmented vascular O-GlcNAc protein content plays a role in the vascular functional changes induced by this peptide, we determined the vascular contraction to the α_1 -adrenergic agonist PE in various conditions. Treatment with ET-1 for 24 hours enhanced contractile responses of rat aortas to PE. Developed force levels were similar to those exhibited by aortas incubated with PugNAc. Furthermore, ET-1 infusion in Wistar rats enhanced aortic contractile responses to PE in comparison with their respective controls, as has been shown in other studies.^{9,23} Of importance, chronic ET-1 infusion did not produce consistent increases in blood pressure (in agreement

Figure 3. ET-1 infusion in vivo for 14 days augments O-GlcNAc levels in aortas and decreases vascular expression of OGA. Top, Representative Western blot images of (A) O-GlcNAc-proteins, (B) OGT, and (C) OGA. Bottom, Corresponding bar graphs showing the relative expression of O-GlcNAc, OGT, and OGA after normalization to β -actin expression. Results are presented as mean $\pm$ SEM for $n=4$ in each experimental group. * $P<0.05$ vs control (rats infused with sodium chloride [0.9%]).

with a recent report by Wang and Wang²⁴), glucose levels, or insulin sensitivity.

Recent work by Clarke et al¹⁴ has demonstrated that antibodies can be targeted to selective signaling cascades in smooth muscle cells of isolated ring segments of arteries. We have performed experiments with arteries incubated for 24 hours using this innovative approach to target signaling cascades as an additional method to complement our pharmacological studies. In our experiments, Chariot protein transfection reagent was used to deliver anti-OGT antibodies to intact aortic rings. The effects of ET-1 are not observed when vessels are transfected previously with antibodies against

OGT. Empty Chariot did not significantly change actions of ET-1. This result is further supported by experiments where arteries were incubated with a selective OGT inhibitor: 3-(2-adamantanylethyl)-2-([4-chlorophenyl]azamethylene)-4-oxo-1,3-thiazaperhydrazone-6-carboxylic acid. This pharmacological inhibitor attenuated both the effects of ET-1 in O-GlcNAc proteins levels and vascular reactivity. On the basis of these observations, we conclude that elevated levels of O-GlcNAc by ET-1 represent a common mechanism underlying the adverse effects of the peptide on vascular function.

We have demonstrated previously that increased levels of O-GlcNAc augments responses to contractile stimuli⁶ and

Table 2. Systolic Blood Pressure and Body Weight in Rats Infused With ET-1 or Submitted to DOCA-Salt Treatment or DOCA-Salt Hypertension, Treated or Not With Atrasentan

Parameter	Control	ET-1 Infused	Uni	DOCA	DOCA+Atrasentan
SBP, mm Hg	117.5 $\pm$ 3	123.4 $\pm$ 4	124.9 $\pm$ 4	163.6 $\pm$ 6*	137.5 $\pm$ 6*
Body weight, g	385 $\pm$ 10	380 $\pm$ 9	391 $\pm$ 13*	320 $\pm$ 7	309 $\pm$ 12*

SBP indicates systolic blood pressure. Values are mean $\pm$ SEM for $N=6$ in each group.

* $P<0.05$ vs respective control.

Figure 4. ET-1 effects on O-GlcNAc protein levels and vascular reactivity are not observed when vessels are transfected previously with antibodies against OGT or incubated with OGT inhibitor. Treatment with (A and B) the OGT inhibitor, as well as (C and D) neutralizing antibodies for anti-OGT [Chariot [OGT]] decrease vascular O-GlcNAc levels. OGT inhibition (A and C) reduced vascular contraction and (B and D) decreased O-GlcNAc proteins levels on ET-1 incubation for 24 hours. B and D, Top, Western blot image of O-GlcNAc proteins. Bottom, Corresponding bar graphs showing the relative O-GlcNAc proteins after normalization to β -actin expression. Experimental values of contraction were calculated relative to the contractile response produced by 120 mmol/L of KCl, which was taken as 100%. Results are presented as mean $\pm$ SEM in each experimental group. * $P < 0.05$ vs vehicle (dimethyl sulfoxide).

that O-GlcNAcylation is associated with the development of increased vascular contractility in DOCA-salt hypertension.⁸ Interestingly, ET-1, for which expression is increased in DOCA-salt hypertension,^{9,10} is associated with vascular dysfunction. Here, we showed that ET-1 exposition in vitro and in vivo not only augments vasoconstriction to PE but also increases O-GlcNAc protein levels and modulates OGT and OGA expression. Accordingly, we demonstrated that treatment with an ET_A receptor antagonist prevents changes in O-GlcNAc levels acutely and chronically induced by ET-1. In addition, treatment with atrasentan was able to normalized O-GlcNAc levels and to prevent an increased contractile response to PE stimulation in arteries from DOCA-salt rats.

One may suggest that atrasentan reduced protein modification via a decrease in blood pressure. However, we found

that atrasentan attenuated, but did not normalize, blood pressure in DOCA-salt rats. In addition, ET-1-infusion for 14 days did not result in changes in blood pressure. It seems that, in this case, O-GlcNAc protein modification does not correlate directly with blood pressure but does correlate with PE reactivity. The use of other antihypertensive agent that does not affect the ET-1 system may help to further elucidate this suggestion.

In this sense, it is well established that increased contractile responsiveness of the vasculature, as a result of increase contraction or decreased relaxation, is a hallmark of hypertension.²⁵ We speculate that ET-1 modulates signaling proteins, via O-GlcNAc modification, that are important for vascular tone control, such as NO synthase, protein kinase C, members of the mitogen-activated protein kinase family, and

Figure 5. ET_A antagonist prevents augmented vascular levels of O-GlcNAc in vivo and in vitro and also abrogates increased contractile responses to PE. **A**, Treatment of DOCA-salt rats with ET_A antagonist prevents augmented vascular O-GlcNAc levels and **(B)** increased contractile responses to PE. ET_A antagonist attenuated the effects of ET-1 incubation for 24 hours on vascular **(C)** O-GlcNAc levels and **(D)** increased contractile responses to PE. **A** and **C**, Top, Western blot image of O-GlcNAc proteins. Bottom, Corresponding bar graphs showing the relative O-GlcNAc proteins after normalization to β -actin expression. **B** and **D**, Experimental values of contraction were calculated relative to the contractile response produced by 120 mmol/L of KCl, which was taken as 100%. Results are presented as mean $\pm$ SEM in each experimental group. * P < 0.05 vs vehicle (H₂O); † P < 0.05 vs Uni.

small G proteins, and that are targets for O-GlcNAcylation. Therefore, O-GlcNAc modification of proteins induced by ET-1 may contribute to an augmented vascular response to constrictor stimuli.

In addition, increasing evidence suggests that O-GlcNAcylation can modulate protein function by interfering with protein phosphorylation. This suggestion takes into consideration that both modifications occur on serine and threonine residues, are dynamically added and removed from proteins in response to cellular signals, and alter the function and association of the modified protein.^{4,20,21} The relationship between O-GlcNAc and phosphorylation is obviously complex but may be a key to understanding the function of O-GlcNAc addition. The reciprocal interplay between

O-GlcNAc and phosphorylation may represent an additional link between ET-1-activated signal transduction mechanisms and the effects of O-GlcNAc on the vasculature. Conversely, phosphorylation has been shown to directly affect OGT expression and activity.²⁶

In conclusion, our data provide evidence that ET-1 augments O-GlcNAc levels, and this modification contributes to the vascular effects of ET-1. We propose that modulation of increased vascular O-GlcNAcylation by ET-1 may represent a novel mechanism contributing to the vasoactive properties of this potent peptide. Definition of O-GlcNAc-modified vascular proteins will contribute to a better understanding of how this posttranslational modification affects vascular reactivity in physiological and pathophysiological conditions.

Perspectives

Arterial hypertension often coexists with diabetes mellitus, and >80% of patients with type 2 diabetes mellitus develop hypertension. Most of the deleterious effects associated with abnormal O-GlcNAcylation have been described in diabetic or hyperglycemic conditions, but we have shown recently that O-GlcNAcylation, which augments vascular contractile responses, is increased in the vasculature of hypertensive animals. The present study showing that O-GlcNAcylation plays a role on ET-1-induced vascular responses further suggests that this posttranslational modification is a key regulator of vascular function. Important insight into the pathological processes leading to vascular dysfunction can be gained from elucidating the mechanisms by which O-GlcNAcylation disrupts vascular function.

Sources of Funding

This study was supported by grants from the National Institutes of Health (HL-74167), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, and Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (Brazil).

Disclosures

None.

References

- Hart GW, Housley MP, Slawson C. Cycling of O-linked β -N-acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins. *Nature*. 2007;446:1017–1022.
- Fülöp N, Marchase RB, Chatham JC. Role of protein O-linked N-acetylglucosamine in mediating cell function and survival in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res*. 2007;73:288–297.
- Lacz B, Hill BG, Wang K, Paterson AJ, White CR, Xing D, Chen YF, Darley-Usmar V, Oparil S, Chatham JC. Protein O-GlcNAcylation: a new signaling paradigm for the cardiovascular system. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009;296:H13–H28.
- Musicki B, Kramer MF, Becker RE, Burnett AL. N-activation of phosphorylated endothelial nitric oxide synthase (Ser-1177) by O-GlcNAc in diabetes-associated erectile dysfunction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:11870–11875.
- Whitworth CE, Macauley MS, Stubbs KA, Dennis RJ, Taylor EJ, Vocadlo DJ. Analysis of PugNag and NAG-thiazoline as transition state analogues for human O-GlcNAcase: mechanistic and structural insights into inhibitor selectivity and transition state poise. *J Am Chem Soc*. 2007;129:635–644.
- Lima VV, Giachini FR, Carneiro FS, Carneiro ZN, Fortes ZB, Carvalho MHC, Webb RC, Tostes RC. Increased vascular O-GlcNAcylation augments reactivity to constrictor stimuli. *JASH*. 2008;2:410–417.
- Federici M, Menghini R, Mauriello A, Hribal ML, Ferrelli F, Lauro D, Sbraccia P, Spagnoli LG, Sesti G, Lauro R. Insulin-dependent activation of endothelial nitric oxide synthase is impaired by O-linked glycosylation modification of signaling proteins in human coronary endothelial cells. *Circulation*. 2002;106:466–472.
- Lima VV, Giachini FR, Choi H, Carneiro FS, Carneiro ZN, Fortes ZB, Carvalho MH, Webb RC, Tostes RC. Impaired vasodilator activity in deoxycorticosterone acetate-salt hypertension is associated with increased protein O-GlcNAcylation. *Hypertension*. 2009;53:166–174.
- Schiffrin EL. Vascular endothelin in hypertension. *Vascul Pharmacol*. 2005;43:19–29.
- Tostes RC, Muscara MN. Endothelin receptor antagonists: another potential alternative for cardiovascular diseases. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord*. 2005;5:287–301.
- Carneiro FS, Nunes KP, Giachini FR, Lima VV, Carneiro ZN, Nogueira EF, Leite R, Ergul A, Rainey WE, Clinton Webb R, Tostes RC. Activation of the ET-1/ETA pathway contributes to erectile dysfunction associated with mineralocorticoid hypertension. *J Sex Med*. 2008;5:2793–2807.
- Morris MC, Depollier J, Mery J, Heitz F, Divita G. A peptide carrier for the delivery of biologically active proteins into mammalian cells. *Nat Biotechnol*. 2001;19:1173–1176.
- Keller M, Lidington D, Vogel L, Peter BF, Sohn HY, Pagano PJ, Pitson S, Spiegel S, Pohl U, Bolz SS. Sphingosine kinase functionally links elevated transmural pressure and increased reactive oxygen species formation in resistance arteries. *FASEB J*. 2006;20:702–704.
- Clarke CJ, Forman S, Pritchett J, Ohanian V, Ohanian J. Phospholipase C-delta1 modulates sustained contraction of rat mesenteric small arteries in response to noradrenaline, but not endothelin-1. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008;295:H826–H834.
- Chitale K, Webb RC, Dorrance AM, Mills TM. Decreased penile erection in DOCA-salt and stroke prone-spontaneously hypertensive rats. *Int J Impot Res*. 2001;13(suppl 5):S16–S20.
- DeFronzo RA, Tobin JD, Andres R. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol*. 1979;237:E214–E223.
- Giachini FRC, Carneiro FS, Lima VV, Carneiro ZN, Carvalho MHC, Fortes ZB, Webb RC, Tostes RC. Pyk2 mediates increased adrenergic contractile responses in arteries from DOCA-salt mice. *J Am Soc Hypertens*. 2008;2:431–438.
- Dong DL, Hart GW. Purification and characterization of an O-GlcNAc selective N-acetyl-beta-D-glucosaminidase from rat spleen cytosol. *J Biol Chem*. 1994;269:19321–19330.
- Dehennaut V, Lefebvre T, Sellier C, Leroy Y, Gross B, Walker S, Cacan R, Michalski JC, Vilain JP, Bodart JF. O-linked N-acetylglucosaminyltransferase inhibition prevents G2/M transition in *Xenopus laevis* oocytes. *J Biol Chem*. 2007;282:12527–12536.
- Zachara NE, Hart GW. Cell signaling, the essential role of O-GlcNAc! *Biochim Biophys Acta*. 2006;1761:599–617.
- Comer FI, Hart GW. Reciprocity between O-GlcNAc and O-phosphate on the carboxyl terminal domain of RNA polymerase II. *Biochemistry*. 2001;40:7845–7852.
- Xing D, Feng W, Not LG, Miller AP, Zhang Y, Chen YF, Majid-Hassan E, Chatham JC, Oparil S. Increased protein O-GlcNAc modification inhibits inflammatory and neointimal responses to acute endoluminal arterial injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008;295:H335–H342.
- Giachini FR, Callera GE, Carneiro FS, Tostes RC, Webb RC. Therapeutic targets in hypertension: is there a place for antagonists of the most potent vasoconstrictors? *Expert Opin Ther Targets*. 2008;12:327–339.
- Wang Y, Wang DH. Prevention of endothelin-1-induced increases in blood pressure: role of endogenous CGRP. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;287:H1868–H1874.
- Bohr DF, Dominiczak AF, Webb RC. Pathophysiology of the vasculature in hypertension. *Hypertension*. 1991;18:III69–III75.
- Cheung WD, Sakabe K, Housley MP, Dias WB, Hart GW. O-linked beta-N-acetylglucosaminyltransferase substrate specificity is regulated by myosin phosphatase targeting and other interacting proteins. *J Biol Chem*. 2008;283:33935–33941.

O-GlcNAcylation contributes to the vascular effects of ET-1 via activation of the RhoA/Rho-kinase pathway

Victor V. Lima^{1,2*}, Fernanda R. Giachini^{1,2}, Fernando S. Carneiro^{1,2},
Maria Helena C. Carvalho², Zuleica B. Fortes², R. Clinton Webb¹, and Rita C. Tostes^{1,3}

¹Department of Physiology, Medical College of Georgia, 1120 Fifteenth Street, CA-3141, Augusta, GA 30912-3000, USA; ²Department of Pharmacology, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo, Sao Paulo, SP, 05508-900, Brazil; and ³Department of Pharmacology, Medical School of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, SP, 14049-900, Brazil

Received 6 August 2010; revised 11 October 2010; accepted 21 October 2010

Time for primary review: 30 days

Aims

Glycosylation with β -N-acetylglucosamine (O-GlcNAcylation) is one of the most complex post-translational modifications. The cycling of O-GlcNAc is controlled by two enzymes: UDP-NAc transferase (OGT) and O-GlcNAcase (OGA). We recently reported that endothelin-1 (ET-1) augments vascular levels of O-GlcNAcylated proteins. Here we tested the hypothesis that O-GlcNAcylation contributes to the vascular effects of ET-1 via activation of the RhoA/Rho-kinase pathway.

Methods and results

Incubation of vascular smooth muscle cells (VSMCs) with ET-1 (0.1 μ M) produces a time-dependent increase in O-GlcNAc levels. ET-1-induced O-GlcNAcylation is not observed when VSMCs are previously transfected with OGT siRNA, treated with ST045849 (OGT inhibitor) or atrasentan (ET_A antagonist). ET-1 as well as PugNAc (OGA inhibitor) augmented contractions to phenylephrine in endothelium-denuded rat aortas, an effect that was abolished by the Rho kinase inhibitor Y-27632. Incubation of VSMCs with ET-1 increased expression of the phosphorylated forms of myosin phosphatase target subunit 1 (MYPT-1), protein kinase C-potentiated protein phosphatase 1 inhibitor protein (protein kinase C-potentiated phosphatase inhibitor-17), and myosin light chain (MLC) and RhoA expression and activity, and this effect was abolished by both OGT siRNA transfection or OGT inhibition and atrasentan. ET-1 also augmented expression of PDZ-Rho GEF (guanine nucleotide exchange factor) and p115-Rho GEF in VSMCs and this was prevented by OGT siRNA, ST045849, and atrasentan.

Conclusion

We suggest that ET-1 augments O-GlcNAcylation and this modification contributes to increased vascular contractile responses via activation of the RhoA/Rho-kinase pathway.

Keywords

β -N-acetylglucosamine • Endothelin-1 • Vascular reactivity • RhoA/Rho-kinase pathway

1. Introduction

The attachment of β -O-linked 2-acetamido-2-deoxy-d-glycopyranose (O-GlcNAc) in nuclear and cytoplasmic proteins, known as O-GlcNAcylation, is one of the most common post-translational modifications.^{1–6} The cycling of O-GlcNAc is controlled by two highly conserved enzymes, O-GlcNAc transferase (OGT or uridine diphospho-N-acetyl glucosamine: polypeptide β -N-acetylglucosaminyl transferase; UDP-NAc transferase) and β -N-acetylglucosaminidase

[O-GlcNAcase (OGA)]. Whereas OGT catalyses the addition of O-GlcNAc to the hydroxyl group of serine or threonine residues of a target protein, OGA catalyses the hydrolytic cleavage of O-GlcNAc from post-translationally modified proteins.^{3,6,7}

Over the past decade, a surge of discoveries in O-GlcNAcylation has revealed new roles for this modification in the cardiovascular system. Many proteins important in vascular function are targets for O-GlcNAcylation,^{3,4,8–10} and recent studies have shown that this post-translational modification interferes with vascular processes.^{10–13}

* Corresponding author. Tel: +1 706 721 7851; fax: +1 706 721 7299, Email: vlma@mcg.edu

Published on behalf of the European Society of Cardiology. All rights reserved. © The Author 2010. For permissions please email: journals.permissions@oup.com.

However, one of the central challenges, specific to the vasculature, is to understand the unique molecular and cellular O-GlcNAcylation signalling as it relates to function.

Endothelin-1 (ET-1), a peptide that plays a crucial role in the vascular function of most organ systems, activates several signalling pathways that include protein kinase C (PKC), mitogen-activated protein kinases (MAPKs), and RhoA/Rho kinase, which is important in Ca^{+2} sensitization of smooth muscle cells.^{14–16} ET-1 also activates transcriptional factors responsible for the coordinated increase in many cytokines and enzymes, thus enhancing inflammation, oxidative stress, fibrosis, and tissue damage,^{17–20} all important in the regulation of vascular tone, vascular injury, and remodelling.

Recent evidence from our laboratory suggests that ET-1 augments O-GlcNAcylation of vascular proteins and that this post-translational modification contributes to ET-1-induced vascular effects. Accordingly, incubation of arterial segments with ET-1 produced a time-dependent increase in O-GlcNAcylation and augmented reactivity to constrictor stimuli. ET-1 effects on O-GlcNAcylation levels and vascular reactivity were prevented by neutralizing antibodies against OGT, the enzyme that catalyses the addition of O-GlcNAc to a target protein, as well as by the OGT inhibitor ST045849 [3-(2-adamantanylethyl)-2-[(4-chlorophenyl) azamethylene]-4-oxo-1,3-thiazaperhydropyridine-6-carboxylic acid; 100 μM].^{11,12} The effects of ET-1 on O-GlcNAcylation levels and vascular reactivity were mediated by activation of ET_A receptors,¹¹ the predominant subtype in vascular smooth muscle cells (VSMCs).^{18,21}

However, our current understanding of the unique molecular O-GlcNAcylation signalling in VSMCs and its relation to vascular function is still incomplete. One of the many central questions to be answered is how changes in O-GlcNAcylation modify vascular reactivity to contractile agents. A recent study has shown that increased flux through the hexosamine biosynthesis pathway, which induces O-GlcNAcylation, increases Rho activity in VSMCs, although a specific role for O-GlcNAcylation was not assessed in that paper.²² In addition, some proteins from the RhoA/Rho-kinase pathway, such as myosin light chains (MLC-1 and MLC-2), Rho GDP-dissociation inhibitor, and PDZ-GEF (guanine nucleotide exchange factor), are targets of O-GlcNAcylation.^{23–26}

In the present study, we hypothesized that ET-1 increases O-GlcNAcylation levels in VSMCs, which leads to increased RhoA/Rho kinase activation, increasing vascular reactivity to constrictor stimuli. To test our hypothesis, we determined whether proteins of the RhoA/Rho-kinase pathway in VSMCs are regulated by O-GlcNAcylation and whether these changes contribute to increased vascular responses to constrictor stimuli.

2. Methods

2.1 Animals

Male Wistar rats (8–10 weeks old, 230–250 g; Harlan Laboratories, Indianapolis, IN, USA) were used in this study. All procedures were performed in accordance with the Guiding Principles in the Care and Use of Animals, approved by the Medical College of Georgia Committee on the Use of Animals in Research and Education and in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health. The animals were housed on a 12 h light/dark cycle and fed a standard chow diet with water *ad libitum*.

2.2 ET-1 incubation procedures

After euthanasia, thoracic aortas were removed and cleaned from fat tissue in an ice-cold physiological salt solution. Endothelium was removed and arterial segments were incubated in Eagle's Minimum Essential Medium containing L-glutamine (1%), fetal bovine serum (FBS, 10%), penicillin (0.5%), and streptomycin (0.5%). Rings were incubated for 24 h with either vehicle [H_2O or dimethyl sulfoxide (DMSO)]; Pugnac [O-(2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranosylidene) amino-N-phenylcarbamate; 100 μM , from Toronto Research Chemicals, Inc, North York, Canada], which blocks OGA activity by mimicking the enzyme-stabilized transition state; or ET-1 (0.1 μM , from Tocris Bioscience, Ellisville, MO, USA). After incubation, aortas were used to evaluate reactivity to phenylephrine (PE, from Sigma-Aldrich; concentration–response curves, 1 nM to 100 μM from Sigma-Aldrich), Vascular reactivity to PE was determined in the presence and absence of 1 μM Y-27632 (from Tocris Bioscience, Ellisville, MO, USA), a specific Rho kinase inhibitor.²⁷

2.3 VSMCs isolation and culture

VSMCs were isolated from rat thoracic aortas by explant, as previously described.²⁸ Cultures were maintained in Dulbecco Modified Eagle's Medium (GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD, USA) supplemented with 10% FBS (Invitrogen, Grand Island, NY, USA). Only fourth-passage cells were used. Immunoreactivity assays were used to characterize the VSMCs and to confirm the absence of other cell types in the cultures. The cells expressed α -smooth muscle actin and calponin, contractile proteins that are indicative of VSMCs. No positive immunoreactivity, to von Willebrand factor VIII or CD31 (platelet endothelial cell adhesion molecule-1), markers of endothelial cells, was detected (data not shown).

After maximum confluence and 24 h removal of serum, cells were incubated with vehicle (H_2O or DMSO), or ET-1 (0.1 nM to 1 μM) for 5 min, 1, 3, 6, 12 or 24 h, to verify the optimal time-point and concentration for ET-1-induced O-GlcNAcylation of VSMCs. In further experiments, incubations were performed for 24 h with: vehicle (H_2O), or ET-1 (0.1 μM). In some experiments, VSMCs were previously incubated with the OGT inhibitor ST045849 [3-(2-adamantanylethyl)-2-[(4-chlorophenyl) azamethylene]-4-oxo-1,3-thiazaperhydropyridine-6-carboxylic acid; 100 μM , for 3 h from TimTec, Newark, DE, USA) or the ET_A antagonist atrasentan (1 μM , for 3 h; kindly provided by Dr Adviye Ergul) or transfected with OGT siRNA (100 nM, as described below).

2.4 Transfection of siRNA

The siRNA for OGT and the siRNA negative control were purchased from Dharmacon, Lafayette, CO, USA. The siRNA (On-Target *plus* Smart pool; 100 nM) was incubated with Lipofectamine 2000 (Invitrogen) in 1.0 mL of serum-free medium for 30 min. The siRNA–Lipofectamine 2000 complex was then added to the cells in 4.0 mL of serum-free medium and maintained for 2 days. In the third day cells were incubated with ET-1 (0.1 μM) for 24 h.

2.5 Western blot analysis

Proteins (30 μg) extracted from VSMCs were separated by electrophoresis, and western blots performed as previously described.¹⁰ Antibodies used were: anti-O-GlcNAc antibody, CTD 110.6 (1:2000; Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA), OGT [1:400, Santa Cruz antibodies], total myosin phosphatase target subunit 1 (MYPT-1), rho-kinase (ROCK)- α , ROCK- β , protein kinase C-potentiated phosphatase inhibitor (CPI)-17, MLC, RhoA [(1:1000) BD Biosciences], PDZ-Rho GEF, p115-Rho GEF [(1:500) Abcam, Inc.] and Rho-GDI (guanine dissociation inhibitor) [(1:1000) Cell Signaling]. Immunoblots for non-phosphoproteins were carried out in the same membranes used to evaluate the phosphorylated (-P) forms: P-MYPT-1 (Thr⁸⁵³), P-CPI-17 (Thr³⁸), and P-MLC (Thr¹⁸/Ser¹⁹) [(1:500); BD Biosciences]. After incubation with secondary antibodies, signals were developed for chemiluminescence, visualized by autoradiography, and quantified densitometrically. Results were

Figure 1 Augmented vascular contraction to PE, after incubation with ET-1 or PugNAc, is abolished by the Rho kinase inhibitor Y-27632. (A) Incubation with ET-1 (0.1 μM) or PugNAc (100 μM) for 24 h increases contractions to PE in endothelium-denuded rat aortas vs. control ($n = 8$ for each group). (B) ET-1 effects on PE responses were abolished by the Rho kinase inhibitor Y-27632 (1 μM, 40 min). Experimental values of contraction were calculated relative to the contractile response produced by KCl 120 mM, which was taken as 100% ($n = 8$). Results are presented as mean $\pm$ SEM in each experimental group. * $P < 0.05$ vs. control.

Figure 2 ET-1 effects on O-GlcNAcylated-proteins are not observed when cells are previously transfected with OGT siRNA, incubated with an OGT inhibitor or with an ETA antagonist. Treatment with (A) the OGT inhibitor (ST045849) or the ET_A antagonist (atrasentan) as well as (B) transfection with the OGT siRNA decrease vascular O-GlcNAcylation, upon ET-1 incubation for 24 h in comparison with VSMCs that were incubated with vehicle (DMSO) or control siRNA for 24 h. On the top, western blot image of O-GlcNAcylated-proteins; on the bottom, corresponding bar graphs showing the relative O-GlcNAcylated-proteins after normalization to β-actin expression ($n = 6$). Results are presented as mean $\pm$ SEM in each experimental group ($n = 6$). * $P < 0.05$ vs. vehicle (DMSO); # $P < 0.05$ vs. control siRNA.

normalized to β -actin [(1:10000), Sigma-Aldrich, Inc.,] protein and expressed as arbitrary units.

2.6 Assessment of RhoA activity

RhoA activity was also determined by using the absorbance-based G-LISA RhoA activation assay kit (Cytoskeleton; Cat. # BK124). The method detects RhoA-GTP bound in cell lysates.

2.7 Data analysis

The results are shown as mean $\pm$ SEM and n represents the number of animals used in the experiments. Contractions were recorded as changes in the displacement (mN) from baseline. Concentration–response curves were fitted using a non-linear interactive fitting program (Graph Pad Prism 4.0; GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) and two pharmacological parameters were obtained: the maximal effect generated by the agonist (or E_{max}) and the negative logarithm of the concentration of agonist that produces 50% of the maximum response [$-\log EC_{50}$ (or pD_2)]. Statistical analyses of E_{max} and pD_2 values were performed using one-way ANOVA or Student's t -test. *Post hoc* comparisons were performed using Newman–Keuls's test. Western blot data were analysed by one-sample t -test and the P -value was computed from the t ratio and the numbers of degrees of freedom. Values of $P < 0.05$ were considered statistically significant.

3. Results

Different time points and concentrations of ET-1 were used in order to determine whether ET-1 elicits changes in O-GlcNAcylation levels in rat aortic VSMCs. ET-1 produced a time-dependent increase in O-GlcNAcylation in VSMCs (see Supplementary material online, Figure S1A). The greatest time-effect of ET-1 incubation on the O-GlcNAcylation levels was observed at 24 h. Incubation of VSMCs with ET-1, from 0.1 nM to 1 μ M (for 24 h) augmented O-GlcNAcylation levels in comparison with cells that were incubated with vehicle (for 24 h). No significant differences in O-GlcNAcylation levels were observed with the different concentrations of ET-1 (see Supplementary material online, Figure S1B). Therefore, the functional and molecular experiments were performed in VSMCs incubated with 0.1 μ M of ET-1, for 24 h. This concentration of ET-1 increases vascular O-GlcNAcylation levels in rat aortas¹¹ and is largely used in the literature for stimulation of cultured cells, allowing comparisons between these two experimental conditions.^{29,30}

Endothelium-denuded aortas incubated with ET-1 displayed increased vascular reactivity to PE, an α 1-adrenergic agonist, and developed similar contractions to those exhibited by aortas incubated with PugNAC, an inhibitor of OGA, the enzyme that catalyses the

Figure 3 ET-1-induced phosphorylation of MYPT-1 (Thr⁸⁵³), CPI-17 (Thr³⁸), and MLC (Thr¹⁸/Ser¹⁹) is not observed when VSMCs are treated with the OGT inhibitor ST045849 or the ETA antagonist atrasentan. (A) Incubation of VSMCs with ET-1 (0.1 μ M), ST045849 or atrasentan did not change expression of ROCK- α , ROCK- β , MYPT-1, MLC, or CPI-17. ET-1 increased expression of the phosphorylated forms of (B) CPI-17 (Thr³⁸), (C) MLC (Thr¹⁸/Ser¹⁹), and (D) MYPT-1 (Thr⁸⁵³), an effect that was not observed when VSMCs were treated with the OGT inhibitor [ST045849]. In addition, treatment with the ET_A antagonist (atrasentan) prevented ET-1-induced increased expression of the phosphorylated forms of (A) CPI-17, (B) MLC and (C) MYPT-1. Bar graphs show the relative expression of P-MYPT-1 (Thr⁸⁵³), P-CPI-17 (Thr³⁸), or P-MLC (Thr¹⁸/Ser¹⁹) after normalization to corresponding total protein expression ($n = 6$). Results are presented as mean $\pm$ SEM in each experimental group. * $P < 0.05$ vs. control.

hydrolytic cleavage of O-GlcNAc from post-translationally-modified proteins (Figure 1A). Augmented aortic contractions to PE after treatment with PugNAc or ET-1 were abolished by the Rho kinase inhibitor Y-27632 (1 μ M, 40 min incubation, Figure 1B).

ET-1 increased O-GlcNAcylation levels in proteins from VSMCs. This effect was not observed when cells were incubated with ST045849, a selective OGT inhibitor, or with atrasentan, an ET_A receptor antagonist (Figure 2A). A similar effect was observed when OGT expression was knocked down by transfection with the OGT siRNA. At this condition, ET-1 effects on O-GlcNAcylated-protein levels were completely abolished (Figure 2B). The siRNA targeting O-GlcNAc transferase (siOGT) decreased levels of OGT mRNA (data not shown) and protein (see Supplementary material online, Figure 2) by $\sim$ 60% when compared with the negative siRNA control.

Considering that O-GlcNAcylation is a highly dynamic post-translational modification that plays a key role in signal transduction pathways and that ET-1 stimulates the RhoA/Rho-kinase pathway, which is important in Ca²⁺ sensitization of smooth muscle cells,^{11,15,31} we investigated whether ET-1-induced augmented vascular O-GlcNAc-modified proteins modulate RhoA/Rho kinase activation.

Our data show that incubation of VSMCs with ET-1 (0.1 μ M) did not change expression of ROCK- α , ROCK- β , CPI-17, MYPT-1, or MLC, but increased expression of the phosphorylated forms of

MYPT-1 (Thr⁸⁵³) and CPI-17 (Thr³⁸), which are involved in RhoA/Rho-kinase-mediated inhibition of myosin phosphatase. ET-1 incubation also augmented levels of P-MLC (Thr¹⁸/Ser¹⁹), which is correlated with smooth muscle contraction. The effects of ET-1 on CPI-17 (Figure 3B), MLC (Figure 3C), and MYPT-1 (Figure 3D) expression and activation were not observed when VSMCs were treated with the OGT inhibitor (ST045849) or previously transfected with the OGT siRNA (Figure 4). In addition, treatment with the ET_A antagonist (atrasentan) prevented ET-1-induced increased expression of the phosphorylated forms of CPI-17 (Figure 3B), MLC (Figure 3C), and MYPT-1 (Figure 3D).

All together, these results suggest that ET-1-induced O-GlcNAcylation of VSMCs proteins leads to activation of the RhoA/Rho-kinase pathway. This post-translational modification and the associated activation of the RhoA/Rho-kinase pathway may be functionally translated into augmented vascular reactivity to constrictor stimuli. This hypothesis is further supported by additional experiments showing that ET-1 increases RhoA activation (Figure 5A) and expression (Figure 5B) in VSMCs, and these effects were abolished in VSMCs previously transfected with OGT siRNA or treated with the OGT inhibitor.

In order to clarify how augmented ET-1-induced O-GlcNAcylation contributes to augmented activation of the RhoA/Rho-kinase

Figure 4 Transfection with OGT siRNA prevents ET-1-induced increased expression of P-MYPT-1 (Thr⁸⁵³), P-CPI-17 (Thr³⁸), and P-MLC (Thr¹⁸/Ser¹⁹). The transfection with OGT siRNA, for 2 days, did not change expression of (A) ROCK- α , ROCK- β , total MYPT-1, MLC, or CPI-17. The effects of ET-1 on (B) P-CPI-17, (C) P-MLC, and (D) P-MYPT-1 expression were not observed when VSMCs were previously transfected with OGT siRNA. Bar graphs show the relative expression of phosphorylated forms of P-MYPT-1 (Thr⁸⁵³), P-CPI-17 (Thr³⁸), and P-MLC (Thr¹⁸/Ser¹⁹) after normalization to corresponding total protein expression ($n = 5$). Results are presented as mean $\pm$ SEM in each experimental group. * $P < 0.05$ vs. siRNA control.

Figure 5 ET-1 increases RhoA activity and expression in VSMCs, and this effect was abolished by previous transfection with OGT siRNA or treatment with the OGT inhibitor and atrasentan. (A) Bar graphs show fold of change in RhoA activity with absorbance at 490 nm. (B) Bar graphs show the relative expression of RhoA after normalization to β-actin expression ($n = 6$). Results are presented as mean $\pm$ SEM in each experimental group. * $P < 0.05$ vs. siRNA control; # $P < 0.05$ vs. control.

pathway, we determined the expression of PDZ-Rho GEF and p115-Rho GEF, which leads to RhoA activation in VSMCs. We also determined Rho-GDI protein expression. ET-1 treatment did not change GDI expression (data not shown), but increased PDZ-Rho GEF and p115-Rho GEF protein expression. This effect was prevented when VSMCs were previously transfected with OGT siRNA (Figure 6A), or incubated with the OGT inhibitor or ET_A antagonist (Figure 6B).

4. Discussion

Important insights into the pathological processes leading to vascular dysfunction can be learned from elucidating the mechanisms by which O-GlcNAcylation modifies vascular function. Recent results from our laboratory indicate that elevated vascular levels of O-GlcNAcylated-proteins represent a common mechanism underlying the adverse effects of ET-1 on VSMCs.¹¹

Several studies have reported that increased O-GlcNAcylation decreases production of NO as a consequence of decreased activity of endothelial NO synthase, reinforcing the concept that O-GlcNAcylation modulates vascular reactivity partially via impairment of endothelial cell function.^{12,13,32} However, our data provide evidence, for the first time, that ET-1 produces a time-dependent

increase in O-GlcNAcylated-modified proteins in VSMCs, leading to the activation of the RhoA/Rho-kinase pathway, which is involved in the maintenance of the vascular contractile status. Additionally, we showed that ET-1 as well as PugNAc incubation increases vascular reactivity to PE in the absence of endothelium, suggesting that this post-translational modification increases vascular reactivity by directly altering VSMCs function.

We performed experiments with VSMCs transfected with an OGT siRNA to knock down OGT expression. The effects of ET-1 on O-GlcNAcylation levels were not observed when VSMCs were previously transfected with OGT siRNA. This result is further supported by experiments where ET-1 effects were prevented in cells incubated with a selective OGT inhibitor (ST045849). Together, these results strongly suggest that ET-1 effects on O-GlcNAcylation levels are mediated by OGT activation.

ET_A receptors are highly expressed in VSMCs and exhibit high affinity for ET-1.^{21,33} Accordingly, the ET_A antagonist atrasentan abrogated ET-1-induced O-GlcNAcylation in VSMCs, indicating that ET_A receptor activation is required for ET-1-induced vascular O-GlcNAcylation.

Several hundred proteins from diverse functional groups can be directly modified by O-GlcNAcylation.^{3,4} Proteins with an important

Figure 6 ET-1-induced augmented expression of PDZ-Rho GEF and p115-Rho GEF is not observed when VSMCs are previously transfected with OGT siRNA, or incubated with OGT inhibitor and ET_A antagonist. On the top, representative western blot images of PDZ-Rho GEF, p115-Rho GEF, and β-actin; on the bottom, bar graphs show the relative PDZ-Rho GEF and p115-Rho GEF proteins after normalization to β-actin expression. Results are presented as mean ± SEM in each experimental group (*n* = 6). **P* < 0.05 vs. siRNA control; #*P* < 0.05 vs. control.

role in the vascular function, such as endothelial nitric oxide synthase, sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase, phospholipase C, PKC, are targets for this post-translational modification. Considering that augmented aortic contractions to PE, after treatment with PugnAc or ET-1, were abolished by the Rho kinase inhibitor Y-27632 and that ET-1 activates the RhoA/Rho kinase signalling,³⁴ we decided to investigate whether increased levels of O-GlcNAcylation modify the RhoA/Rho-kinase pathway.

The process of smooth muscle contraction is principally regulated by the phosphorylation of MLC, activated by Ca²⁺-calmodulin, enabling the molecular interaction of myosin with actin.^{27,35} The state of MLC phosphorylation is further regulated by myosin phosphatase, which removes the phosphate from MLC to promote smooth muscle relaxation. Myosin phosphatase isolated from smooth muscle is a holoenzyme consisting of three subunits: a small subunit, a catalytic subunit, and a MYPT-1. Most recently, some studies have shown that MLC is also a target for O-GlcNAcylation.^{26,36}

Our data show that ET-1 increases expression of the phosphorylated forms of MYPT-1 (Thr⁸⁵³), CPI-17 (Thr³⁸), and MLC (Thr¹⁸/Ser¹⁹). The effects of ET-1 on the activation of those proteins are not observed when cells are previously transfected with OGT siRNA, treated with an ET_A antagonist (atrasentan) or an OGT inhibitor (ST045849). It is known that stimulation of ET_A receptor by ET-1 induces RhoA/Rho kinase activation.^{15,37} Here we show for the first time, that this activation can be mediated by increased O-GlcNAcylation of proteins. It has already been proposed that O-GlcNAcylation may counteract the effect of phosphorylation leading

to increased Ca²⁺ sensitivity of muscle fibres and myofilament assembly. Thus, an imbalance between phosphorylation/O-GlcNAcylation may alter actin–myosin interactions and myosin assembly, and therefore, favour/promote contraction.^{26,38}

Inhibition of MYPT-1, by phosphorylation at the Thr⁸⁵³ site, decreases the enzymatic activity of myosin phosphatase, allowing MLC to remain phosphorylated, and therefore, promoting contraction.³⁵ In addition, the small protein CPI-17, once phosphorylated, is able to bind to the catalytic subunit of myosin phosphatase inhibiting the enzyme's activity, and prolonging smooth muscle contraction.

Cheung *et al.* have shown that changes in protein activity, such as MYPT-1, as well as changes in cell physiology are associated with transient and dramatic alterations in O-GlcNAcylation levels.^{9,39} Thus, one may speculate that increased vascular O-GlcNAcylation by ET-1 may result in increased RhoA/Rho kinase activation, increasing vascular reactivity to constrictor stimuli. In support to this hypothesis, our data show that RhoA expression and activation is increased by ET-1 in VSMCs, and this effect is abolished by previous transfection with OGT siRNA or treatment with the OGT inhibitor.

There are three Rho-guanine nucleotide exchange factors (Rho-GEFs) identified in smooth muscle cells: PDZ-Rho GEF, leukaemia-associated RhoGEF, and p115-RhoGEF. Rho GEFs promote RhoA activation by enabling the exchange of nucleotides between RhoA-GDP and RhoA-GTP. Increased expression or activation of Rho GEF proteins augments contractile activation of smooth muscle, via RhoA-dependent mechanisms. We observed that ET-1 treatment increases PDZ-Rho GEF and p115-Rho GEF

protein expression and this effect was prevented when VSMCs were previously transfected with OGT siRNA, incubated with the OGT inhibitor or ET_A antagonist. Therefore, it seems that OGT inhibition prevents activation of RhoA by ET-1, in accordance with our hypothesis.

The mechanisms by which O-GlcNAcylation lead to activation of components of the RhoA/Rho-kinase pathway are not known, but one possibility includes changes in phosphorylation levels of these components. Accordingly, both modifications occur on serine and threonine residues, are dynamically added and removed from proteins in response to cellular signals, and alter the function and association of the modified proteins.^{32,40} It has been shown that increased O-GlcNAcylation results in lower phosphorylation at 280 sites and causes increased phosphorylation at 148 sites, which implies that the interaction between these two translational modifications is large.⁴¹ We may speculate that O-GlcNAc modification on sites close or adjacent to where phosphorylation occurs may increase activation of contractile proteins and components of the ET-1/ETA receptor pathway, or decrease the activity of proteins involved in the relaxation process or in the desensitization of ET-1 receptors.

Hence, we cannot exclude the possibility that increased activation of ET-1 receptors modulates the transcriptional machinery to induce or to suppress expression of proteins that regulates O-GlcNAc levels. We have recently shown that ET-1 infusion for 14 days reduces OGA expression and that incubation of arterial segments with ET-1 for 24 h modifies OGT and OGA expression at different time points.¹¹

In summary, our data strongly suggest that ET-1 augments vascular O-GlcNAcylation and this modification increases vascular reactivity via activation of the RhoA/Rho-kinase pathway. We speculate that the modulatory effect of ET-1 on vascular O-GlcNAcylation may represent a novel mechanism underlying the effects of the peptide on vascular function. Our results add to the understanding of the mechanisms by which O-GlcNAcylation alters vascular function and open the possibility that O-GlcNAcylation may represent a novel therapeutic target for the treatment of pathological conditions associated with augmented vascular ET-1 expression, such as salt-sensitive forms of hypertension.

Supplementary material

Supplementary material is available at *Cardiovascular Research* online.

Conflict of interest: none declared.

Funding

This study was supported by grants from the National Institutes of Health (HL-74167) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Brazil.

References

- Hart GW, Haltiwanger RS, Holt GD, Kelly WG. Glycosylation in the nucleus and cytoplasm. *Annu Rev Biochem* 1989;**58**:841–874.
- Holt GD, Hart GW. The subcellular distribution of terminal N-acetylglucosamine moieties. Localization of a novel protein-saccharide linkage, O-linked GlcNAc. *J Biol Chem* 1986;**261**:8049–8057.
- Hart GW, Housley MP, Slawson C. Cycling of O-linked beta-N-acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins. *Nature* 2007;**446**:1017–1022.
- Fulop N, Marchase RB, Chatham JC. Role of protein O-linked N-acetylglucosamine in mediating cell function and survival in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res* 2007;**73**:288–297.
- Wells L, Vosseller K, Hart GW. Glycosylation of nucleocytoplasmic proteins: signal transduction and O-GlcNAc. *Science* 2001;**291**:2376–2378.
- Lima VVRC, Hardy DM, Webb RC, Tostes RC. 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**:374–387.
- Wells L, Gao Y, Mahoney JA, Vosseller K, Chen C, Rosen A et al. Dynamic O-glycosylation of nuclear and cytosolic proteins: further characterization of the nucleocytoplasmic beta-N-acetylglucosaminidase, O-GlcNAcase. *J Biol Chem* 2002;**277**:1755–1761.
- Love DC, Hanover JA. The hexosamine signaling pathway: deciphering the "O-GlcNAc code". *Sci STKE* 2005;**312**:re13.
- Zachara NE, Hart GW. Cell signaling, the essential role of O-GlcNAc! *Biochim Biophys Acta* 2006;**1761**:599–617.
- Lima VV, Giachini FR, Carneiro FS, Carneiro ZN, Fortes ZB, Carvalho MHC et al. Increased vascular O-GlcNAcylation augments reactivity to constrictor stimuli. *J Am Soc Hypertens* 2008;**2**:410–417.
- Lima VV, Giachini FR, Carneiro FS, Carneiro ZN, Saleh MA, Pollock DM et al. O-GlcNAcylation contributes to augmented vascular reactivity induced by endothelin 1. *Hypertension* 2010;**55**:180–188.
- Lima VV, Giachini FR, Choi H, Carneiro FS, Carneiro ZN, Fortes ZB et al. Impaired vasodilator activity in deoxycorticosterone acetate-salt hypertension is associated with increased protein O-GlcNAcylation. *Hypertension* 2009;**53**:166–174.
- Federici M, Menghini R, Mauriello A, Hribal ML, Ferrelli F, Lauro D 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* 2002;**106**:466–472.
- Allahdadi KJ, Walker BR, Kanagy NL. ROK contribution to endothelin-mediated contraction in aorta and mesenteric arteries following intermittent hypoxia/hypercapnia in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;**293**:H2911–2918.
- Homma N, Nagaoka T, Morio Y, Ota H, Gebb SA, Karoor V et al. Endothelin-1 and serotonin are involved in activation of RhoA/Rho kinase signaling in the chronically hypoxic hypertensive rat pulmonary circulation. *J Cardiovasc Pharmacol* 2007;**50**:697–702.
- Scherer EQ, Herzog M, Wangemann P. Endothelin-1-induced vasospasms of spiral modiolary artery are mediated by rho-kinase-induced Ca(2+) sensitization of contractile apparatus and reversed by calcitonin gene-related Peptide. *Stroke* 2002;**33**:2965–2971.
- Hynynen MM, Khalil RA. The vascular endothelin system in hypertension—recent patents and discoveries. *Recent Pat Cardiovasc Drug Discov* 2006;**1**:95–108.
- Schiffirin EL. Vascular endothelin in hypertension. *Vascul Pharmacol* 2005;**43**:19–29.
- Schiffirin EL, Touyz RM. Vascular biology of endothelin. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998;**32**:S2–13.
- Touyz RM, Schiffirin EL. Role of endothelin in human hypertension. *Can J Physiol Pharmacol* 2003;**81**:533–541.
- Yazawa H, Iida-Kubota E, Honma Y, Honda K. Characterization of the endothelin receptor in primary cultures of human aortic smooth muscle cells. *Jpn J Pharmacol* 1993;**63**:313–318.
- Kawamura H, Yokote K, Asami S, Kobayashi K, Fujimoto M, Maezawa Y et al. High glucose-induced upregulation of osteopontin is mediated via Rho/Rho kinase pathway in cultured rat aortic smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;**24**:276–281.
- Khidekel N, Ficarro SB, Peters EC, Hsieh-Wilson LC. Exploring the O-GlcNAc proteome: direct identification of O-GlcNAc-modified proteins from the brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;**101**:13132–13137.
- Clark PM, Dweck JF, Mason DE, Hart CR, Buck SB, Peters EC et al. Direct in-gel fluorescence detection and cellular imaging of O-GlcNAc-modified proteins. *J Am Chem Soc* 2008;**130**:11576–11577.
- Hart GW, Akimoto Y. The O-GlcNAc modification. In: Varki ACR, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, Hart GW, Etzler ME, ed. *Essentials of Glycobiology* 2nd ed. Cold Spring Harbor NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009.
- Hedou J, Cieniewski-Bernard C, Leroy Y, Michalski JC, Mounier Y, Bastide B. O-linked N-acetylglucosaminylation is involved in the Ca²⁺ activation properties of rat skeletal muscle. *J Biol Chem* 2007;**282**:10360–10369.
- Uehata M, Ishizaki T, Satoh H, Ono T, Kawahara T, Morishita T et al. Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature* 1997;**389**:990–994.
- Ross R. The smooth muscle cell. II. Growth of smooth muscle in culture and formation of elastic fibers. *J Cell Biol* 1971;**50**:172–186.
- Yogi A, Callera GE, Montezano AC, Aranha AB, Tostes RC, Schiffirin EL et al. Endothelin-1, but not Ang II, activates MAP kinases through c-Src independent Ras-Raf dependent pathways in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;**27**:1960–1967.
- Sakai H, Chiba Y, Misawa M. Role of Rho kinase in endothelin-1-induced phosphorylation of CPI-17 in rat bronchial smooth muscle. *Pulm Pharmacol Ther* 2007;**20**:734–739.
- Cain AE, Tanner DM, Khalil RA. Endothelin-1-induced enhancement of coronary smooth muscle contraction via MAPK-dependent and MAPK-independent Ca(2+)(i) sensitization pathways. *Hypertension* 2002;**39**:543–549.

32. Musicki B, Kramer MF, Becker RE, Burnett AL. Inactivation of phosphorylated endothelial nitric oxide synthase (Ser-1177) by O-GlcNAc in diabetes-associated erectile dysfunction. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;**102**:11870–11875.
33. Bouallegue A, Daou GB, Srivastava AK. Endothelin-1-induced signaling pathways in vascular smooth muscle cells. *Curr Vasc Pharmacol* 2007;**5**:45–52.
34. Ivey ME, Osman N, Little PJ. Endothelin-1 signalling in vascular smooth muscle: pathways controlling cellular functions associated with atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2008;**199**:237–247.
35. Hilgers RH, Webb RC. Molecular aspects of arterial smooth muscle contraction: focus on Rho. *Exp Biol Med (Maywood)* 2005;**230**:829–835.
36. Cieniewski-Bernard C, Bastide B, Lefebvre T, Lemoine J, Mounier Y, Michalski JC. Identification of O-linked N-acetylglucosamine proteins in rat skeletal muscle using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics* 2004;**3**:577–585.
37. Chiba Y, Sakai H, Misawa M. Endothelin-1-induced translocation of RhoA is mediated by endothelin ET(A) receptors in rat bronchial smooth muscle. *Eur J Pharmacol* 2005;**517**:182–185.
38. Laczy B, Hill BG, Wang K, Paterson AJ, White CR, Xing D et al. Protein O-GlcNAcylation: a new signaling paradigm for the cardiovascular system. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009;**296**:H13–H28.
39. Cheung WD, Sakabe K, Housley MP, Dias WB, Hart GW. O-linked beta-N-acetylglucosaminyltransferase substrate specificity is regulated by myosin phosphatase targeting and other interacting proteins. *J Biol Chem* 2008;**283**:33935–33941.
40. Comer FI, Hart GW. Reciprocity between O-GlcNAc and O-phosphate on the carboxyl terminal domain of RNA polymerase II. *Biochemistry* 2001;**40**:7845–7852.
41. Wang Z, Gucsek M, Hart GW. Cross-talk between GlcNAcylation and phosphorylation: site-specific phosphorylation dynamics in response to globally elevated O-GlcNAc. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;**105**:13793–13798.