Universidade de São Paulo – USP
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP
Departamento de Farmacologia

Modificação de proteínas por O-GlcNAc em artérias humanas: alterações na
hipertensão arterial.

Thiago Braidó Dias

Ribeirão Preto – SP
2018

Thiago Braido Dias

Modificação de proteínas por O-GlcNAc em artérias humanas: alterações na hipertensão arterial.

Versão Original

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: Profa. Dra. Rita de Cássia Aleixo Tostes Passaglia

Ribeirão Preto – SP

2018

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Dias, Thiago Braido

Modificação de proteínas por O-GlcNAc em artérias humanas: alterações na hipertensão arterial, 2018.

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

Orientadora: Tostes, Rita de Cássia Aleixo

1- O-GlcNAc. 2- Hipertensão. 3- Humanos. 4- Reatividade Vascular. 5- Artéria Mesentérica.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Dias, T.B. Modificação de proteínas por O-GlcNAc em artérias humanas: alterações na hipertensão arterial. Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

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

Aprovado em: 20 / 02 / 2018

Banca examinadora

Profa. Dra. Rita de Cássia Aleixo Tostes Passaglia

Instituição: FMRP – USP Assinatura: _____

Prof. Dr. José Carlos Farias Alves Filho

Instituição: FMRP – USP Assinatura: _____

Prof. Dr. Luis Vicente Garcia

Instituição: FMRP – USP Assinatura: _____

Profa. Dra. Natasha Elizabeth Zachara

Instituição: JHU Assinatura: _____

Profa. Dra. Ivone Carvalho

Instituição: FCFRP – USP Assinatura: _____

Dedico esse trabalho à minha esposa Renata, pelo seu amor, paciência e apoio incansável. Por sempre me fazer ir mais longe e nunca desistir.

Aos meus pais Vládir e Maria Inês, por todo o amor, carinho, dedicação e esforço na minha criação e educação. Sem seu apoio e incentivo essa conquista não teria acontecido.

À minha orientadora Rita Tostes por toda amizade, confiança e oportunidade. Por me inspirar com dedicação e amor a realizar uma pesquisa ética e verdadeira.

AGRADECIMENTOS

À Deus, que conferiu a mim a sabedoria, a responsabilidade e a resiliência que me fizeram trilhar esse caminho até aqui.

À minha esposa, Renata, que está sempre ao meu lado, que me faz ser uma pessoa melhor todos os dias. Muito obrigado por todo o amor e sacrifícios, essenciais para me manter na trilha para a realização desse sonho.

Aos meus pais Vládir Dias e Maira Inês Braido, pois sem vocês nada seria possível.

A minha orientadora, prof.a Rita, por acreditar que eu seria capaz de chegar até aqui, mesmo com meus horários alternativos.

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

À prof.a Natasha Zachara pela oportunidade, orientação e ensinamentos que contribuíram para a conclusão dessa tese.

Aos meus amigos do laboratório da prof.a Rita Tostes: Fabíola, Carla, Camila Z., Camila A, Nathanne, Karla, Rhéure, Marcondes, Thiago, Stêfany, Fernanda, Vania, Rafael F., Rafael M., Pedro, Juliano, Allan, Josiane, Emiliana, Aline e Júlio pela colaboração, ensinamentos e agradável convívio.

Aos meus amigos do laboratório da prof.a Natasha Zachara: Roger, Cathrine, Kamau, Marissa, Jen, Partha, Devin, Austin e Peter por toda a ajuda, paciência e atenção, muito importantes para a conclusão desse trabalho.

Ao prof. Fernando por toda ajuda, conhecimento e companheirismo durante todos esses anos.

Ao prof. Prado por acreditar em mim desde o começo da graduação, sua presença e orientação foi fundamental em toda minha caminhada até aqui.

Ao prof. Vicente que colaborou e viabilizou a existência de todo esse projeto, desde a coleta das amostras ao meu estágio no exterior.

Aos professores Ribeiro e Omar e a toda equipe de médicos assistentes e residentes da Coloproctologia por toda a ajuda e colaboração na coleta das amostras.

Às secretárias do Departamento de Farmacologia: Soninha, Fátima e Gislaine e do Departamento de Bioquímica da Johns Hopkins: Darlene, pelo auxílio com os assuntos burocráticos.

A todos os participantes dessa pesquisa que doaram parte de si para gerar conhecimento que poderá ajudar muitos outros no futuro.

RESUMO

DIAS, T. B. **Modificação de proteínas por O-GlcNAc em artérias humanas: alterações na hipertensão arterial.** 2018. Tese de doutorado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Vários mecanismos controlam os processos de contração e relaxamento das células musculares lisas vasculares (CMLVs). Receptores e moléculas sinalizadoras intracelulares, os quais controlam os processos de contração e relaxamento das CMLVs, são alvo de modificações pós-traducionais, como a O-GlcNAcilação que modula respostas vasculares. O aumento de proteínas modificadas por O-GlcNAc apresenta efeito ambíguo sobre as CMLVs, sendo protetor em situações de aumento agudo, mas lesivo quando mantido cronicamente. O aumento crônico de O-GlcNAc em animais está associado a repostas contráteis mais intensas e redução do relaxamento vascular, assim como o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), denominado estresse oxidativo, alterações constantemente descritas em doenças crônicas como diabetes e hipertensão arterial. Considerando que algumas proteínas que controlam a contratilidade vascular são modificadas por O-GlcNAc e que pouco se sabe a respeito da via de Biossíntese das Hexosaminas (VBH) e sua relação com o sistema vascular em humanos, nós investigamos a hipótese de que modificações de proteínas por O-GlcNAc estão relacionadas a alterações vasculares na hipertensão arterial em humanos. Durante a realização de nossos experimentos, demonstramos que os principais componentes da VBH estão presentes em CMLVs humanas. O tratamento com Thiamet G (TMG) por 24 h aumentou os níveis de proteínas modificadas por O-GlcNAc nas CMLVs pela redução da atividade de OGA, assim como induziu efeito compensatório de aumento da expressão dessa enzima. TMG reduziu a atividade de OGA em CMLVs no grupo Controle, mas não promoveu alteração na geração de EROs. Após tratamento com TMG, artérias de grupo Controle apresentaram maior sensibilidade à noradrenalina (NA) e maior relaxamento ao nitroprussiato de sódio (NPS); enquanto o grupo Hipertenso não apresentou alterações na contratilidade ou no relaxamento arterial. Artérias do grupo Hipertenso apresentaram maior sensibilidade à NA que o grupo

Controle antes de qualquer tratamento, além de deficiência no relaxamento, com menor sensibilidade e menor resposta máxima ao NPS em comparação ao grupo Controle. O grupo Hipertenso apresentou aumento da pressão arterial média de internação (PAMi), assim como da idade, quando comparado com o grupo Controle. Em conclusão, a VBH está presente nas CMLVs humanas. A inibição da atividade da OGA por TMG aumenta os níveis de proteínas modificadas por O-GlcNAc, a expressão de OGA e modula a reatividade vascular no grupo Controle, mas não no grupo Hipertenso. Os resultados demonstram que pacientes hipertensos apresentam respostas vasculares a drogas vasoativas diferentes daquelas observadas em pacientes controle, antes e após o aumento dos níveis de proteínas modificadas por O-GlcNAc nas CMLVs. Novos estudos serão necessários para determinar se as alterações observadas são decorrentes da hipertensão arterial e/ou do tratamento farmacológico aos quais os pacientes estão submetidos.

Palavras-chave: O-GlcNAc. Hipertensão. Humanos. Reatividade Vascular. Artéria Mesentérica.

ABSTRACT

DIAS, T. B. **O-GlcNAc modification of proteins in human arteries: changes in arterial hypertension.** 2018. Ph.D. Thesis – Faculdade de Medicina de Ribeirao Preto – Universidade de Sao Paulo, Ribeirao Preto, 2018.

Several mechanisms control the contraction and relaxation processes in the vascular smooth muscles cells (VSMC). Intracellular receptors and signaling molecules involved in contraction and relaxation mechanisms are targets of post-translational modifications (PTM), such as O-GlcNAcylation, which modulates vascular responses. Augmented levels of O-GlcNAc-modified proteins show a dual effect in VSMC, being protective during acute stressful events and deleterious when O-GlcNAc is chronically augmented. In animals, chronic increases in O-GlcNAc-modified proteins are linked to increased vascular responses to constrictor agents, to reduced vascular relaxation in response to dilator drugs, and to increased production of reactive oxygen species (ROS), named oxidative stress. All these changes are frequently described in chronic diseases such as diabetes and arterial hypertension. Since proteins involved in vascular contractility are modified by O-GlcNAc, and our knowledge on the influence of the hexosamine biosynthesis pathway (HBP) in the human vascular system is limited, we tested the hypothesis that proteins modified by O-GlcNAc contribute to vascular changes in hypertensive patients. Our data show that human VSMC express the main components of the HBP; the treatment of human VSMC with Thiamet G (TMG) for 24 h augmented O-GlcNAc levels, decreased OGA activity and induced a compensatory increase in OGA's expression. TMG reduced OGA activity, increased levels of O-GlcNAc-modified proteins but did not change ROS generation in human arteries from the Control group. After treatment with TMG, arteries from the Control group exhibited increased sensitivity to norepinephrine (NE) and to sodium nitroprusside (SNP), as well as increased maximum relaxation to SNP. Augmented O-GlcNAc levels produced no changes in contractile or relaxation responses in the Hypertensive group. Arteries from the Hypertensive group exhibited an increased sensitivity to NE as well as decreased sensitivity and maximum relaxation to SNP when compared to arteries from the

Control group. Mean arterial blood pressure (hMABP) and the average age were increased in patients from the Hypertensive group. In conclusion, the HBP is present in human VSMC and the inhibition of OGA activity with TMG increases O-GlcNAc levels, increases OGA expression and modifies vascular responses to constrictor and dilator stimuli in human arteries from the Control group, but not from the Hypertensive group. These results indicate that hypertensive patients have altered vascular responses to vasoactive drugs both in the absence and in the presence of augmented O-GlcNAc levels. Further research is needed to explain whether these differences are due to the hypertensive disease and/or to the patient's medical treatment.

Keywords: O-GlcNAc. Hypertension. Humans. Vascular reactivity. Mesenteric arteries.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.1.1 – Via de biossíntese das hexosaminas	22
Figura 4.1.1 – Identificação dos componentes da Via de Biossíntese das Hexosaminas	39
Figura 4.1.2 – Efeito de TMG e PUGNAc sobre a atividade enzimática de OGA no grupo Controle	40
Figura 4.2.1 – Influência de TMG e PUGNAc nos níveis de proteínas modificadas por O-GlcNAc em artérias mesentéricas do grupo Controle	41
Figura 4.2.2 – Influência de TMG e PUGNAc na expressão de OGA em artérias mesentéricas do grupo Controle	42
Figura 4.2.3 – Influência de TMG e PUGNAc na expressão de OGT em artérias mesentéricas do grupo Controle	43
Figura 4.3.1 – Influência de TMG e PUGNAc nos níveis de proteínas modificadas por O-GlcNAc em artérias mesentéricas do grupo Hipertenso	44
Figura 4.3.2 – Influência de TMG e PUGNAc na expressão de OGA em artérias mesentéricas do grupo Hipertenso	45
Figura 4.3.3 – Influência de TMG e PUGNAc na expressão de OGT em artérias mesentéricas do grupo Hipertenso	46
Figura 4.3.4 – Efeito de TMG e PUGNAc sobre a atividade enzimática de OGA no grupo Hipertenso	47
Figura 4.4.1 – Comparação da expressão dos componentes da VBH entre os grupos Controle e Hipertenso, subgrupos Após Isolamento	48

Figura 4.4.2 – Comparação dos efeitos de TMG na expressão dos componentes da VBH em artérias dos grupos Controle e Hipertenso	49
Figura 4.4.3 – Comparação dos efeitos de PUGNAc na expressão dos componentes da VBH em artérias dos grupos Controle e Hipertenso	49
Figura 4.4.4 – Comparação da atividade de OGA entre os grupos Controle e Hipertenso antes e após tratamento com TMG ou PUGNAc	50
Figura 4.4.5 – Comparação da atividade de OGT entre os grupos Controle e Hipertenso antes e após tratamento com TMG ou PUGNAc	51
Figura 4.5.1 – Geração de EROs no grupo Controle, antes e após tratamento com TMG	52
Figura 4.5.2 – Geração de EROs no grupo Hipertenso, antes e após tratamento com TMG	52
Figura 4.5.3 – Comparação da geração de EROs entre os grupos Controle e Hipertenso	53
Figura 4.6.1 – Influência do TMG na resposta vascular contrátil à noradrenalina no grupo Controle	54
Figura 4.6.2 – Influência do TMG na resposta vascular de relaxamento ao nitroprussiato de sódio no grupo Controle	55
Figura 4.6.3 – Influência do TMG na resposta vascular contrátil à noradrenalina no grupo Hipertenso	56
Figura 4.6.4 – Influência do TMG na resposta vascular de relaxamento ao nitroprussiato de sódio no grupo Hipertenso	56

Figura 4.6.5 – Comparação da resposta vascular contrátil à noradrenalina entre os grupos Controle e Hipertenso	58
Figura 4.6.6 – Comparação da resposta vascular de relaxamento ao nitroprussiato de sódio entre os grupos Controle e Hipertenso	59
Figura 4.7.1 – Comparação da idade e da PAMi entre os grupos Controle e Hipertenso	61
Figura 4.7.2 – Distribuição dos pacientes dos grupos Controle e Hipertenso de acordo com as patologias apresentadas	62
Figura Apêndice A – Confirmação da inviabilidade de detecção da proteína GFAT em artérias mesentéricas humanas	83
Figura Apêndice B – Parâmetros moleculares observados em artérias do subgrupo Após Isolamento e Veículo nos grupos Controle e Hipertenso	84
Figura Apêndice C – Respostas moleculares e reatividade vascular ao tratamento com TMG 1 μ M no grupo Controle	85
Figura Apêndice D – Geração de EROs no grupo Controle, antes e após tratamento com TMG e Veículo	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.7.1 – Lista de anticorpos primários e seus respectivos anticorpos secundários	36
Tabela 4.6.1 – Valores de $E_{máx}$ e pD_2 para noradrenalina e nitroprussiato de sódio em segmentos de artéria mesentérica de pacientes do grupo Controle	55
Tabela 4.6.2 – Valores de $E_{máx}$ e pD_2 para noradrenalina e nitroprussiato de sódio em segmentos de artéria mesentérica de pacientes do grupo Hipertenso	57
Tabela 4.6.3 – Valores de $E_{máx}$ e pD_2 para noradrenalina e nitroprussiato de sódio em segmentos de artéria mesentérica de pacientes dos grupos Controle e Hipertenso	60
Tabela 4.7.1 – Valores da média e erro padrão da média para Pressão Arterial Média na internação e Idade dos grupos Controle e Hipertenso	63
Tabela Apêndice E – Identificação das amostras usadas nas imagens representativas de western blotting	87
Tabela Apêndice F – Diferentes tratamentos para controle da HAS utilizados pelos pacientes participantes do grupo Hipertenso	88

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4MU-GalNAc	4-metillumbiferol <i>N</i> -acetilgalactosamina
4MU-GlcNAc	4-metillumbiferol <i>N</i> -acetilglucosamina
Acetil-CoA	Acetil-coenzima A
Ach	Acetilcolina
AKT 1	Serina/treonina cinase 1 AKT
AMP	Monofosfato de adenosina
AMPK	Proteína cinase ativada por AMP
BCA	Ácido Bicinconínico
Bcl-2	Proteína antiapoptótica de linfoma de células B2
C ₃ H ₅ O ₃ .Na	Lactato de sódio
Ca ⁺²	Íons cálcio
CaCl ₂ .2H ₂ O	Cloreto de cálcio di-hidratado
Ci	Curie - número de desintegrações por segundo (1Ci = 3,7.10 ¹⁰ desintegrações/s)
CINC-2 β	Fator quimiotático de neutrófilo induzido por citocina 2 β
CIP-17	Proteína de 17 kDa inibidora de fosfatase e dependente de proteína cinase C
CKII	Caseína cinase II
CMLV	Célula de músculo liso vascular
DHE	Di-hidroetídio
DMEM	Meio Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
E _{máx}	Concentração necessária para a droga produzir sua resposta máxima
eNOS	Óxido nítrico sintetase endotelial
EROs	Espécies reativas de oxigênio
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GFAT	Glutamina:frutose 6-fosfato transferase
GlcNAc	<i>N</i> -acetilglucosamina

GLUT 4	Transportador de glicose tipo 4
FAS	Ácido graxo sintase
<i>g</i>	Constante internacional para força de aceleração gravitacional ($\cong 9,8 \text{ m/s}^2$)
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HAT	Histona acetil-transferase
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfônico
His6-OGT	OGT recombinante
HOCl	Ácido hipocloroso
HSC 70	Proteína de choque térmico 70
I/R	Isquemia / reperfusão
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular 1
IL-6	Interleucina-6
IRS 1/2	Substrato para receptor de insulina 1/2
KCl	Cloreto de potássio
KH ₂ PO ₄	Fosfato monopotássico
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos 1
MgSO ₄	Sulfato de magnésio
MLC	Cadeia leve de miosina
mmHg	Milímetros de mercúrio
mN	MiliNewton
mOGT	OGT mitocondrial
MPT	modificação pós-traducional
MYPT-1	Subunidade regulatória da miosina fosfatase
NA	Noradrenalina
NaCl	Cloreto de sódio
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
NF- κ B	Fator de transcrição nuclear <i>kappa</i> B
NPS	Nitroprussiato de sódio
O-GlcNAc	O-glicosilação com <i>N</i> -acetilglucosamina
OGA	β - <i>N</i> -acetilglucosaminidase
OGT	β - <i>N</i> -acetilglucosamina transferase

OH ⁻	Radical hidroxil
OONO ⁻	Peroxinitrito
p38 MAPK	Proteína cinase ativada por mitógeno p38
PAMi	Pressão arterial média da internação
PBS	Tampão fosfato-salino
pD ₂	Logaritmo negativo da concentração necessária para a droga produzir metade de sua resposta máxima
PI3K	Fosfoinositídeo 3-cinase
PKC	Fosfocinase C
PLC	Fosfolipase C
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
PUGNAc	<i>O</i> -(2-acetamido-2-deoxi- <i>D</i> -glicopiranosilidenamino)- <i>N</i> -fenilcarbamato
RhoA/Rho	Cinase RhoA/Rho
Ser	Serina
SERCA	Enzima Ca ²⁺ -ATPase do retículo sarcoplasmático
sOGT	OGT curta
Sp1	Fator de transcrição 1
Sp3	Fator de transcrição 3
Thiamet G	[(3 <i>aR</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>R</i> ,7 <i>aR</i>)-2-(etilamino)-3 <i>a</i> ,6,7,7 <i>a</i> -tetrahidro-5-(hidroximetil)-5 <i>H</i> -Pirano[3,2- <i>d</i>]thiazole-6,7-diol]
TMG	Thiamet G
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
Tre	Treonina
UDP-GlcNAc	Uridina 5'-difosfato- <i>N</i> -acetilglucosamina
VBH	Via de biossíntese de hexosaminas
VCAM-1	Molécula de adesão celular vascular 1
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial
X-box 1	Proteína de ligação x-box 1

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
1.1	O-GlcNAc	20
1.2	O-GlcNAc no Sistema Vascular	24
2	OBJETIVO GERAL	30
2.1	Objetivos específicos	30
3	MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1	População de estudo	31
3.2	Medida da pressão arterial	31
3.3	Coleta dos segmentos arteriais	31
3.4	Reatividade vascular	32
3.5	Fluorescência por di-hidroetídio	33
3.6	Preparo das amostras para os ensaios da OGA e da OGT	33
3.6.1	Atividade enzimática da OGA	34
3.6.2	Atividade enzimática da OGT	34
3.7	Western blotting	35
3.8	Análise estatística	36
4	RESULTADOS	38
4.1	Presença dos componentes da via de biossíntese das hexosaminas em artérias de humanos	38
4.2	Tratamento com Thiamet G ou PUGNAc e a expressão dos componentes da VBH do grupo Controle	40
4.3	Tratamento com Thiamet G ou PUGNAc e a expressão dos componentes da VBH do grupo Hipertenso	43
4.4	Diferenças nas respostas ao tratamento com Thiamet G e PUGNAc entre os grupos Controle e Hipertenso	47
4.5	Tratamento com Thiamet G não altera a geração de EROs nos grupos Controle e Hipertenso	51
4.6	Alterações na função vascular dos grupos Controle e Hipertenso após tratamento com Thiamet G	53
4.7	Diferenças entre os grupos populacionais estudados	60

5	DISCUSSÃO	64
6	CONCLUSÃO	72
	REFERÊNCIAS	73
	APÊNDICE	83
	Apêndice A – Confirmação da inviabilidade de detecção da proteína GFAT em artérias mesentéricas humanas	83
	Apêndice B – Parâmetros moleculares observados em artérias do subgrupo Após Isolamento e Veículo nos grupos Controle e Hipertenso	84
	Apêndice C – Respostas moleculares e reatividade vascular ao tratamento com TMG 1 µM por 24 h no grupo Controle	85
	Apêndice D – Geração de EROs no grupo Controle, antes e após tratamento com TMG e Veículo	86
	Apêndice E – Identificação das amostras usadas nas imagens representativas de western blotting	87
	Apêndice F – Diferentes tratamentos para controle da HAS utilizados pelos pacientes participantes do grupo Hipertenso	88
	Apêndice G – Termo de consentimento Livre e Esclarecido do grupo Controle	89
	Apêndice H – Termo de consentimento Livre e Esclarecido do grupo Hipertenso	94

1 INTRODUÇÃO

Uma vascularização saudável é essencial para o transporte de hormônios, gases, nutrientes e resíduos metabólicos para/de todos os tecidos do corpo. O sistema vascular está sob controle de mecanismos finamente regulados por uma variedade de substâncias endócrinas e parácrinas, pela atividade do sistema nervoso simpático, fatores derivados de células imunes, sanguíneas e do endotélio.

Essas substâncias interferem direta e/ou indiretamente com a contração e relaxamento das células musculares lisas vasculares (CMLVs) e não é surpresa que alterações vasculares estão relacionadas a diversas doenças, incluindo diabetes, hipertensão arterial, retinopatia, doença renal crônica, disfunção erétil, câncer, etc (SAFAR; BOUDIER, 2005).

O fato de que muitos receptores e moléculas sinalizadoras intracelulares são alvo de modificações pós-traducionais (MPTs) (ZACHARA et al., 2004), adição reversível de pequenos grupos químicos que causam alterações na atividade ou localização dessas proteínas, aumenta ainda mais a complexidade da regulação do tônus das CMLVs. Entre essas MPTs, temos especial interesse na glicosilação.

1.1 O-GlcNAc

No início da década de 1980, Torres e Hart descreveram pela primeira vez a adição de um açúcar, *N*-acetilglucosamina (GlcNAc), a proteínas da superfície de linfócitos (TORRES; HART, 1984). Posteriormente, Holt e Hart observaram que a ligação entre GlcNAc e proteínas apresentava localização quase exclusiva no núcleo e citoplasma de hepatócitos de ratos (HOLT; HART, 1986). A ligação do açúcar simples β -*N*-acetilglucosamina ao oxigênio (O-GlcNAc) do grupamento hidroxila da cadeia lateral de resíduos de serina (Ser) e treonina (Tre) de proteínas, O-GlcNAcilação, tem se mostrado abundante em diversas regiões da célula, principalmente no núcleo (HANOVER et al., 1987) e citoesqueleto (HOLT et al., 1987). Várias proteínas como fosfatases, fatores de transcrição e cinases são alvo dessa modificação (HART et al., 1989; HART; HOUSLEY; SLAWSON, 2007; WELLS; VOSELLER; HART, 2001), que não está associada a processos de alongação ou modificações posteriores, o que a torna bastante distinta das clássicas

formas de glicosilação de proteínas como *N*-glicosilação; *P*-glicosilação; *C*-glicosilação e glipiação (adição de glicosilfosfatidilinositol à proteínas por meio de ligação covalente) (SPIRO, 2002; VARKI; SHARON, 2009).

A modificação de proteínas por O-GlcNAc foi encontrada em todos os metazoários estudados até o momento e diversos vírus apresentam proteínas modificadas por O-GlcNAc (HART, 1997). O-GlcNAc também está relacionada à sinalização de fatores de crescimento em plantas (HARTWECK et al., 2006). No entanto, ainda não foram identificados, em fungos, genes que codifiquem as enzimas da via: O-GlcNAc transferase (OGT; uridina difosfo-*N*-acetilglucosamina; polipeptídeo β -*N*-acetilglucosaminil transferase ou UDP-NAc transferase) e β -*N*-acetilglucosaminidase (OGA ou O-GlcNAcase). Essa modificação pós-traducional é altamente dinâmica e estima-se envolver mais de 3000 proteínas (LEE et al., 2016). Por exemplo, Lee et al. descreveram 990 proteínas que sofrem modificações por O-GlcNAc após submeter cultura de fibroblastos de embriões de camundongos a estresse com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (LEE et al., 2016).

Em mamíferos, o processo de O-GlcNAcilação é controlado diretamente pelas enzimas acima descritas: OGT, que catalisa a adição do monossacarídeo aos resíduos de Ser e Tre das proteínas, e OGA, que catalisa a remoção hidrolítica de O-GlcNAc das proteínas (LACZY et al., 2009; LIMA; RIGSBY; et al., 2009). OGT utiliza o açúcar nucleotídeo 5'-difosfato-*N*-acetilglucosamina (UDP-GlcNAc) como substrato (BOND; HANOVER, 2015; LUBAS et al., 1997), e sua atividade é muito sensível à concentração citoplasmática do mesmo. O substrato UDP-GlcNAc é o produto final da Via de Biossíntese das Hexosaminas (VBH) (BOND; HANOVER, 2015; HART et al., 2011).

Durante sua formação, uma molécula de glicose é convertida a glicose 6-fosfato pela enzima hexocinase e, então, à frutose 6-fosfato pela glicose 6-fosfato isomerase. A molécula de frutose 6-fosfato entra na VBH e é convertida em glucosamina 6-fosfato pela glutamina:frutose 6-fosfato amidotransferase (GFAT), sendo este o passo limitante da via. O passo seguinte envolve a formação de *N*-acetilglucosamina 6-fosfato pela enzima glucosamina 6-fosfato acetil-transferase pela adição de uma molécula de Acetil-CoA. Na sequência, *N*-acetilglucosamina 1-fosfato é gerada pela ação da enzima fosfoglicomutase 3 e, finalmente, a enzima pirofosforilase catalisa a conjugação do nucleotídeo uridina à molécula, formando

UDP-GlcNAc (DASSANAYAKA; JONES, 2014; GROVES et al., 2013) (Figura 1.1.1).

Figura 1.1.1 – Via de biossíntese das hexosaminas. A ilustração demonstra as enzimas envolvidas na síntese de UDP-GlcNAc a partir de seus precursores (glicose, glucosamina, acetil-CoA e UTP) e a consequente modificação de proteínas por O-GlcNAc. A transferência de UDP-GlcNAc é mediada pela OGT e sua remoção pela OGA. Modificado de: 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, n. 2, p. 80-95, Feb 2010.

A VBH é um ponto chave no metabolismo energético da célula, pois sofre influência do metabolismo da glicose, de aminoácidos, de ácidos graxos e de nucleotídeos. Essa interação entre os diversos metabolismos celulares tornam a produção de UDP-GlcNAc altamente sensível ao fluxo de nutrientes celulares (LACZY et al., 2009; ZACHARA; HART, 2006). Os principais fatores que aumentam o fluxo pela VBH são a maior disponibilidade de glicose e glucosamina, que são metabolizadas pela enzima GFAT. Estima-se que 2-5% do total de glicose intracelular seja direcionado para a VBH (BUTKINAREE; PARK; HART, 2010; HANOVER; KRAUSE; LOVE, 2010; HART et al., 2007). A conversão de frutose 6-fosfato em glucosamina 6-fosfato, utilizando a glutamina como doador do grupamento amina, é o passo limitante na VBH. Ácidos graxos também aumentam o fluxo na via, de forma indireta, uma vez que o seu aumento inibe a glicólise,

elevando os níveis de frutose 6-fosfato, além de acetil-CoA, produzido no metabolismo dos ácidos graxos, servir como doador para a acetilação da glucosamina na formação de UDP-GlcNAc (HU; SHIMOJI; HART, 2010; WANG, J. et al., 1998).

A enzima OGT é uma glicosiltransferase única, pois é uma proteína solúvel que não apresenta nenhuma homologia às demais glicosiltransferases e se apresenta predominantemente no núcleo (LUBAS; HANOVER, 2000; ZACHARA; HART, 2006). Foram identificadas três isoformas diferentes de OGT, uma com aproximadamente 116 kDa localizada no núcleo e citoplasma (HANOVER et al., 2003), a segunda isoforma com 103 kDa, de localização mitocondrial (LOVE et al., 2003), e a terceira com 78 kDa, denominada de OGT curta e localizada principalmente no núcleo e no citoplasma (HANOVER et al., 2003; NOLTE; MULLER, 2002; SHAFI et al., 2000). Todas as OGT apresentam dois domínios, um N-terminal com repetições tetratricopeptídicas e um C-terminal onde se localiza o domínio catalítico, que são separados por uma sequência de localização nuclear bipartite (KREPPEL; BLOMBERG; HART, 1997; LUBAS et al., 1997). A diferença entre as isoformas de OGT está no domínio N-terminal, com diferentes números de repetições tetratricopeptídicas, responsáveis pela sua localização e interação com outras proteínas (WELLS et al., 2004; ZACHARA; HART, 2006).

A OGA é uma proteína solúvel, expressa no citosol de todos os tecidos já examinados (GAO et al., 2001; WELLS et al., 2002). É específica para β -N-acetilglucosamina e é regulada pela interação com outras proteínas, como por exemplo a ácido graxo sintase (FAS) (GAO et al., 2001; GROVES et al., 2017; WELLS et al., 2002), pela fosforilação em resíduos de Ser, bem como por O-GlcNAcilação, com efeitos funcionais ainda não elucidados (GAO et al., 2001; WELLS et al., 2002). A enzima apresenta dois domínios funcionais, um domínio hexosaminidase N-terminal e um domínio histona acetiltransferase (HAT) C-terminal, que se apresenta em duas isoformas: a isoforma completa com a presença de HAT no domínio C-terminal de 130 kDa e a isoforma curta sem HAT de 75 kDa (GROVES et al., 2013). Não há diferença entre as isoformas quanto à atividade catalítica, mas sim quanto a sensibilidades distintas aos inibidores farmacológicos disponíveis. A OGA curta apresenta certa resistência a PUGNAc *O*-(2-acetamido-2-deoxi-D-glicopiranosilidenamino-N-fenilcarbamato (KIM, E. J. et al., 2007), e ambas são efetivamente inibidas por Thiamet G (TMG) [(3aR,5R,6S,7R,7aR)-2-(etilamino)-

3a,6,7,7a-tetrahidro-5-(hidroximetil)-5H-Pirano[3,2-d]tiazole-6,7-diol] (YUZZA et al., 2008).

1.2 O-GlcNAc no Sistema Cardiovascular

Desde a primeira evidência de que o aumento agudo dos níveis de proteínas modificadas por O-GlcNAc são citoprotetores (ZACHARA et al., 2004), diversos estudos têm mostrado que a ativação da VBH aumenta a sobrevivência e função de células cardíacas após condições de estresse agudo, como lesão por isquemia/reperfusão (I/R), trauma hemorrágico, sobrecarga de íons cálcio (Ca^{+2}) e geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) (CHATHAM et al., 2008; JONES et al., 2008; LACZY et al., 2009; NGOH et al., 2009; NGOH et al., 2011). Por outro lado, a redução dos níveis de proteínas modificadas por O-GlcNAc por meio do aumento da expressão de OGA diminui a tolerância de cardiomiócitos ao estresse oxidativo (NGOH et al., 2009).

Estudos com modelos *in vivo* de trauma/hemorragia e modelos *in vitro* de isquemia/reperfusão demonstraram que o aumento dos níveis de proteínas modificadas por O-GlcNAc durante a ressuscitação/reperfusão é particularmente eficiente em aumentar a sobrevivência e a recuperação da função cardíaca (LACZY et al., 2010; LIU; MARCHASE; CHATHAM, 2007; YANG, S. et al., 2006; ZOU et al., 2007). Wang et al. (WANG, Z. V. et al., 2014) descreveram que a ativação da proteína de ligação X-box 1 (*Xbp1s*, *X-box-binding protein 1*, *spliced*) ativa a transcrição de GFAT1 mediante diferentes formas de estresse, incluindo isquemia/reperfusão. Em miócitos cardíacos isolados, o aumento de O-GlcNAc diminui a apoptose por I/R (CHAMPATTANACHAI; MARCHASE; CHATHAM, 2007) e atenua a perda do potencial de membrana mitocondrial, além de elevar os níveis de Bcl-2, proteína antiapoptótica (FULOP et al., 2007).

A administração de glucosamina durante a ressuscitação, após indução de trauma hemorrágico, aumenta o débito cardíaco em duas vezes (YANG, S. et al., 2006), assim como melhora a perfusão de diversos órgãos como rins e cérebro e diminui os níveis circulantes de citocinas inflamatórias IL-6 e TNF- α . A infusão do inibidor PUGNAc após a indução do trauma hemorrágico produz os mesmos efeitos obtidos com glucosamina (ZOU et al., 2007), demonstrando que os efeitos observados com glucosamina estão relacionados ao aumento de proteínas

modificadas por O-GlcNAc e não a um possível efeito de maior aporte energético às células pela conversão de glucosamina-6-fosfato e frutose-6-fosfato e posterior direcionamento à via glicolítica.

Em modelo de pré-condicionamento isquêmico *in vivo*, Jones et al. (JONES et al., 2008) demonstraram que a administração de PUGNAc promoveu aumento dos níveis de proteínas modificadas por O-GlcNAc em miócitos cardíacos e redução da área de infarto. Resultados muito próximos foram obtidos tratando-se os animais com PUGNAc 8 horas (h) antes do experimento. Como demonstrado por estes autores, a função cardioprotetora do O-GlcNAc pode estar relacionada a atenuação da perda de potencial de membrana mitocondrial. A modificação por O-GlcNAc de canais iônicos voltagem-dependentes, componentes dos poros de transição de permeabilidade mitocondrial, reduz o influxo de Ca^{2+} e o inchamento osmótico dessa organela, prevenindo a extrusão do conteúdo mitocondrial e posterior apoptose (JONES et al., 2008). O tratamento de camundongos com um inibidor da OGT (*1,3-diazinano-2,4,5,6-tetrona* ou *2,4,5,6(1H,3H)-pirimidinatetrona* ou aloxana, um análogo do UDP-GlcNAc) reduz a modificação dos canais iônicos voltagem-dependentes mitocondriais, sensibilizando as mitocôndrias miocárdicas à formação dos poros de transição de permeabilidade mitocondrial (NGOH et al., 2008).

Estudos de Griffiths e Murata relacionam a sobrecarga de Ca^{2+} como um fator chave na formação de poros de transição de permeabilidade mitocondrial induzida por isquemia/reperfusão e, em modelos de isquemia aguda do miocárdio, a inibição do aumento de Ca^{2+} mitocondrial confere cardioproteção (GRIFFITHS et al., 1998; MURATA et al., 2001). O aumento dos níveis de proteínas modificadas por O-GlcNAc diminui a sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial pós-isquêmico em miócitos cardíacos neonatais de ratos (NGOH et al., 2010), diminui a perda de potencial de membrana mitocondrial e a liberação de citocromo c (JONES et al., 2008; NGOH; JONES, 2008) e aumenta os níveis de Bcl-2 nessas mesmas células (CHAMPATTANACHAI; MARCHASE; CHATHAM, 2008). Possivelmente, o aumento de proteínas modificadas por O-GlcNAc ativa a translocação de Bcl-2 para a mitocôndria, aumentando a interação com canais iônicos voltagem-dependentes, bloqueando a formação de poros de transição de permeabilidade mitocondrial (NGOH et al., 2010).

Apesar dos efeitos benéficos descritos, O-GlcNAc apresenta efeitos antagônicos. O aumento dos níveis de proteínas modificadas por O-GlcNAc nas

células de forma sustentada e por longos períodos promove efeitos deletérios. Neste sentido, o aumento do fluxo na VBH está associado à resistência insulínica e à interferência na atividade de diversas proteínas de regulação metabólica como proteína cinase ativada pelo AMP (AMPK, *AMP-activated protein kinase*), substrato para receptor de insulina 1/2 (IRS1/2, *insulin receptor substrate 1/2*), serina/treonina cinase 1 AKT (Akt, *AKT serine/threonine kinase 1*) e transportador de glicose 4 (GLUT4) (LUO et al., 2007; PATTI et al., 1999).

Em miócitos cardíacos de ratos adultos mantidos em meio rico em glicose por um dia, foram observadas alterações do acoplamento excitação-contração muscular (prolongamento do potencial de ação, redução da remoção do Ca^{2+} citosólico, e prolongamento do relaxamento muscular) (DAVIDOFF; REN, 1997; DUTTA et al., 2002; REN et al., 1997). Todas essas alterações foram descritas em miócitos cardíacos de animais diabéticos nos estudos de Davidoff e Lacombe (DAVIDOFF, 2006; LACOMBE et al., 2007), associadas a diminuição da atividade da enzima Ca^{2+} -ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA) (DUTTA et al., 2002). Os efeitos sobre o acoplamento excitação-contração foram reproduzidos ao utilizar glucosamina nas mesmas culturas celulares (LACZY et al., 2009; REN et al., 1997). A redução da atividade da SERCA é uma das alterações observadas no retículo sarcoplasmático e está associada ao desenvolvimento e progressão da insuficiência cardíaca (LACZY et al., 2009).

A modificação de proteínas por O-GlcNAc também apresenta profunda importância na função arterial. Diversas proteínas chave são alvo dessa alteração como a SERCA, acima descrita, eNOS, fosfolipase C (PLC), proteína cinase C (PKC), fosfoinositídeo 3-cinase (PI3K) e proteínas envolvidas na formação e modelação do citoesqueleto e microtúbulos (CHEUNG et al., 2008; HART et al., 2007; ZACHARA; HART, 2006).

Quando submetidas a lesão ou estresse, as artérias apresentam um padrão específico de resposta, sendo a inflamação parte importante na patogênese de diversas doenças cardiovasculares (GIACHINI et al., 2009; LIMA et al., 2012; LIU et al., 2006; XING et al., 2008), como diabetes, envelhecimento e hipertensão arterial (AKIMOTO et al., 2001; FULOP et al., 2008; LIMA; GIACHINI; et al., 2009). Artérias lesadas expressam grande número de proteínas de adesão, entre elas P-Selectina, molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1, *intercellular adhesion molecule 1*) e molécula de adesão celular vascular 1 (VCAM-1, *vascular cell adhesion molecule 1*);

além de quimiocinas específicas para neutrófilos e monócitos como fator quimiotático de neutrófilo induzido por citocina 2 β (CINC-2 β , *cytokine-induced neutrophil chemoattractant 2 β*) e proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1, *monocyte chemotactic protein 1*) (MILLER et al., 2004; MILLER et al., 2007; XING et al., 2008).

O aumento de O-GlcNAc em carótidas de ratas ooforectomizadas tem importante efeito protetor na lesão vascular arterial aguda mediada por balão. O tratamento prévio com glucosamina ou PUGNAc, 2 h antes de induzida a lesão, reduziu a expressão de mediadores pró-inflamatórios, assim como inibiu a infiltração de neutrófilos e monócitos. Foi observado também redução da proliferação endotelial após 14 dias da lesão (MILLER et al., 2004; MILLER et al., 2007; XING et al., 2008; XING et al., 2004). Em células endoteliais incubadas com glucosamina por 2 h, Ju et al observaram redução do processo inflamatório pela inibição da expressão de ICAM-1 e MCP-1, induzida pela modificação por O-GlcNAc da enzima proteína cinase ativada por mitógeno p38 (p38 MAPK, *p38 mitogen-activated protein-kinase*) e do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B – *nuclear factor kappa B*) (JU et al., 2008).

O aumento de O-GlcNAc em células endoteliais e CMLVs contribui com a complexa patogênese da disfunção vascular relacionada à diabetes. A hiperglicemia atua em diversas vias, com aumento do estresse oxidativo, aumento do fluxo pela via dos polióis, aumento da glicação de proteínas, aumento da atividade da PKC e aumento do fluxo pela VBH (BROWNLEE, 2001; LACZY et al., 2009). A modificação dos fatores de transcrição Sp1 e Sp3 induzem aumento da expressão do receptor de fator de crescimento vascular endotelial (VEGF, *vascular endothelial growth factor*), aumento da expressão das moléculas de adesão ICAM-1 e VCAM-1 (HATA et al., 1998; YAO et al., 2007). A liberação desses mediadores leva a importante infiltração da parede arterial e do tecido perivascular por células inflamatórias e está correlacionada à subsequente proliferação endotelial e a maior permeabilidade vascular (HATA et al., 1998; MILLER et al., 2004; MILLER et al., 2007; XING et al., 2008; XING et al., 2004).

Lima et al. demonstraram que artérias tratadas com endotelina-1 (ET-1, *endothelin-1*) apresentam aumento da contratilidade vascular, mediada pela ativação da via RhoA/Rho-cinase e aumento das formas fosforiladas de miosina fosfatase

total subunidade alvo 1 (MYPT-1, *total myosin phosphatase target subunit 1*) (Tre⁸⁵³), proteína de 17 kDa inibidora de fosfatase e dependente de / potencializada por proteína cinase C (CPI-17, *protein kinase C-potentiased phosphatase inhibitor 17*) (Tre³⁸) e cadeia leve de miosina (MLC, *myosin light chain*) (Tre¹⁸/Ser¹⁹), promovendo e prolongando a contração arterial (LIMA; GIACHINI; CARNEIRO; et al., 2011). O efeito foi anulado quando as células foram tratadas com inibidor da OGT, demonstrando que esse efeito é mediado pelo aumento de proteínas modificadas por O-GlcNAc (LIMA; GIACHINI; CARNEIRO; et al., 2011). Foi observado que a redução de *N*-acetilglucosamina livre, em preparação de músculo esquelético de ratos, leva à redução da sensibilidade e afinidade da fibra muscular ao Ca^{2+} (HEDOU et al., 2007). Portanto, o aumento de O-GlcNAc intracelular em CMLVs favorece a contração arterial por diversas vias, entre elas a redução da atividade da SERCA (LACZY et al., 2009) e o aumento da sensibilidade dos miofilamentos ao Ca^{2+} .

Outro importante mecanismo de lesão vascular é o excesso de produção de EROs, capaz de induzir inflamação, angiogênese, hipertrofia, deposição de proteínas na matriz extracelular e remodelamento vascular, contribuindo para a disfunção vascular e aumento da pressão arterial sistêmica (AUCH-SCHWELK; KATUSIC; VANHOUTTE, 1989; RODRIGUEZ-MARTINEZ et al., 1998; SZABO, 2003; TOUYZ; BRIONES, 2011; YANG, Z. W. et al., 1999). EROs são compostos intermediários reativos do metabolismo do O_2 , como ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxil (OH^-), ácido hipocloroso (HOCl) e peroxinitrito (OONO^-), produzidos por todas as células e controlados por sistemas antioxidantes (GRECH et al., 1996; TOUYZ; BRIONES, 2011; WHITE et al., 1994).

A produção de EROs é essencial na manutenção da fisiologia cardiovascular e o desbalanço entre produção e inativação de EROs tem papel fundamental no desenvolvimento das lesões vasculares. O aumento de EROs em células vasculares, denominado estresse oxidativo, é constantemente descrito em diversas doenças crônicas como diabetes e hipertensão arterial sistêmica (HAS), aterosclerose, lesão por isquemia e reperfusão, infarto agudo do miocárdio e insuficiência cardíaca (LANDMESSER; HARRISON, 2001; TOUYZ; SCHIFFRIN, 2004).

Se por um lado está bem estabelecido que EROs modulam a atividade de várias cinases e fosfatases (FLINDER et al., 2011; KEYSE, 1999; KIM, J. et al.,

2004; KONISHI et al., 1997; WEBER et al., 2004; WU et al., 2010), temos pouco conhecimento a respeito do papel das EROs sobre O-GlcNAcilação no sistema vascular. Já foi demonstrado que o estresse oxidativo estimula a via de biossíntese de hexosaminas (VBH) e a O-GlcNAcilação (BROWNLEE, 2001) e que o aumento de fluxo na VBH é capaz de induzir estresse oxidativo (KANETO et al., 2001; SINGH et al., 2007). Alterações vasculares secundárias a hiperglicemia/diabetes também estão relacionadas ao aumento da geração de EROs (GIACCO; BROWNLEE, 2010; RAJAPAKSE et al., 2009). Neste sentido, hiperglicemia aumenta o fluxo na VBH, potencializa inflamação vascular e promove disfunção endotelial principalmente via estresse oxidativo (RAJAPAKSE et al., 2009).

2 OBJETIVO GERAL

O presente estudo testa a hipótese de que a modificação de proteínas por O-GlcNAc modula a reatividade vascular em humanos e investiga possíveis alterações de componentes chave da VBH em artérias de pacientes hipertensos.

2.1 Objetivos específicos

Determinar em artérias de resistência de pacientes:

- a) a presença de enzimas da Via de Biossíntese das Hexosaminas;
- b) se o tratamento com TMG ou PUGNAc, drogas que inibem a enzima OGA, promove aumento de proteínas modificadas por O-GlcNAc e altera a expressão dos componentes da VBH;
- c) se a expressão de componentes da VBH e os efeitos de inibidores de OGA estão alterados em pacientes com hipertensão arterial;
- d) a presença de aumento na quantidade de EROs em artérias de pacientes hipertensos e se o tratamento com TMG interfere no acúmulo de EROs;
- e) os efeitos do aumento de proteínas modificadas por O-GlcNAc na reatividade vascular em pacientes normotensos e hipertensos;
- f) se há relação entre a expressão dos componentes da VBH e a função vascular em pacientes normotensos e hipertensos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 População de estudo

Foram incluídos nesse estudo 50 pacientes de ambos os sexos na faixa etária entre 26 e 88 anos, submetidos às cirurgias de colectomia total, colectomia parcial, retossigmoidectomia e amputação abdomino-perineal, secundárias a neoplasias de intestino, polipose, doença diverticular do cólon e colopatias funcionais no Serviço de Coloproctologia do Departamento de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, situado no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto. Esses pacientes foram divididos em dois grupos de estudo: Hipertenso (apresentavam HAS controlada, 18 participantes) e Controle (não apresentavam HAS, 32 participantes). Todos foram submetidos a anestesia regional peridural com ropivacaína 0,3% 15-20 mL, associada a anestesia geral endovenosa com propofol (3 – 5 mg/Kg/h) e remifentanil (0,006 – 0,024 mg/Kg/h) administrados continuamente. Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP-USP de acordo com processo HCRP n.º 14189/2012.

3.2 Medida da pressão arterial

Os pacientes foram internados três dias antes da cirurgia e tinham sua pressão arterial aferidas três vezes ao dia. Para cada medida da pressão arterial foi determinada a pressão arterial média PAM – pressão arterial sistólica (PAS) somada à duas vezes a pressão arterial diastólica (PAD) e o resultado dividido por três: $PAM = [PAS + 2.(PAD)]/3$, a média das PAMs dos últimos 3 dias de internação antes da cirurgia foi utilizada para definir a pressão arterial média da internação (PAMi) de cada paciente. A PAMi em mmHg foi convertida para miliNewton (mN) e esse valor foi utilizado como tensão basal para estabilização nos ensaios de reatividade vascular.

3.3 Coleta dos segmentos arteriais

Imediatamente após a ressecção cirúrgica do segmento intestinal, foram dissecados pequenos segmentos do mesocolon (constituído pelo feixe vasculo-

nervoso e gordura perivascular), lavados cinco vezes com 20 mL de solução ringer lactato contendo (mM): NaCl, 102,6; KCl, 4; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1,3; lactato de sódio ($\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_3\text{Na}$), 1,8; pH 6,0 – 7,5; osmolaridade de 272 mOsm/L; e conservado na mesma solução a 4 °C até posterior dissecação fina com lupa, 8 h após o início do procedimento cirúrgico. Segmentos das ramificações das artérias mesentéricas superior ou inferior com 1 mm de diâmetro externo foram seccionados para a realização dos experimentos. Os vasos foram então divididos em três subgrupos: a) subgrupo Após Isolamento: colocados em solução salina fisiológica Krebs-Henseleit, a 37 °C [contendo (mM): NaCl, 130; NaHCO_3 , 14,9; KCl, 4,7; KH_2PO_4 , 1,18; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,18; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1,56; EDTA, 0,026; e glicose, 5,5] e imediatamente submetidos ao ensaio de reatividade vascular, ou congelados imediatamente em nitrogênio líquido e mantidos à -70 °C para realização dos demais experimentos. b) subgrupo Thiamet G (100 μM ou 1 μM): incubadas em meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco [*Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM)] (GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD, USA) contendo Thiamet G, 100 μM ou 1 μM , [(3aR,5R,6S,7R,7aR)-2-(etilamino)-3a,6,7,7a-tetrahidro-5-(hidroximetil)-5H-Pirano[3,2-d]tiazole-6,7-diol] (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA), ou seu veículo, Dimetilsulfóxido 0,1% (DMSO) (Sigma-Aldrich Inc., EUA). c) subgrupo PUGNAc (10 μM): incubados em meio DMEM contendo PUGNAc, 10 μM , O-(2-acetamido-2-deoxi-D-glicopiranosilidenamino-N-fenilcarbamato (Sigma-Aldrich Inc., EUA) ou seu veículo Metanol 0,1%. Posterior à incubação, os segmentos arteriais foram submetidos ao ensaio de reatividade vascular ou congelados imediatamente em nitrogênio líquido e mantidos à -70 °C para realização dos demais experimentos.

3.4 Reatividade Vascular

Anéis arteriais de 3 mm de comprimento foram montados em miógrafo Mulvany-Halpern (modelo 610; DMT, Inc. USA, Ann Arbor, MI) para registro de tensão isométrica. Os dados foram adquiridos e gravados pelo sistema de aquisição PowerLab 8/SP (ADInstruments, Inc., Colorado Springs, CO). As artérias foram estabilizadas em salina fisiológica Krebs-Henseleit por 45 minutos, a 37 °C sob borbulhamento com carbogênio (5% de CO_2 e 95% de O_2) (GIACHINI et al., 2010; GIACHINI et al., 2009; HILGERS; TODD; WEBB, 2006; LIMA et al., 2010; LIMA; GIACHINI; et al., 2009). A tensão utilizada no miógrafo para a estabilização dos

anéis arteriais foi determinada individualmente para cada paciente, como descrito anteriormente. Para verificar a integridade dos vasos, os mesmos foram estimulados com cloreto de potássio (KCl, 120 mM) durante 15 minutos, após o período de estabilização. Após o estímulo com KCl, os anéis arteriais foram lavados com solução salina fisiológica Krebs-Henseleit em intervalos de 10 minutos, durante 30 min. Em seguida foram realizadas curvas concentração-resposta para noradrenalina (NA – 1 η M a 1 mM) e/ou nitroprussiato de sódio (NPS – 0,1 η M a 1 mM), em todos os subgrupos já descritos.

3.5 Fluorescência por di-hidroetídio

Di-hidroetídio (DHE) (MORETTO, 2013) é um indicador de geração de EROs e foi usado neste estudo como descrito por (CHIGNALIA et al., 2012). Segmentos de artéria mesentérica dos três subgrupos descritos anteriormente foram imersos em meio específico para congelamento de tecidos e armazenados em freezer à -70 °C. Secções de 10 μ m de espessura foram dispostas em lâminas de vidro utilizando Cryostat. No dia do experimento, esses cortes foram incubados em uma câmara umidificada com tampão fosfato-salino (PBS) à 37 °C e protegida da luz por 30 minutos. Após esse período, DHE a 50 mM (em PBS) foi aplicado sobre os cortes e mantidos na câmara protegida da luz a 37 °C por mais 30 minutos. As imagens foram obtidas pela excitação/emissão (η m) 518/605, usando microscópio óptico, objetiva de 20x. Os resultados foram descritos como a razão em relação ao subgrupo Após Isolamento, cujo valor da média foi, arbitrariamente, definido como 1.

3.6 Preparo das amostras para os ensaios de atividade da OGA e da OGT

Preparo para o lisado de tecido. Uma solução tampão de HEPES [ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfônico] (25 mM, pH: 8.0) foi utilizada nos ensaios de atividade da OGA e da OGT. A menos que esteja descrito a solução tampão HEPES foi suplementada pelos seguintes inibidores imediatamente antes do uso: coquetel de inibidores de proteases II e III (EMD Millipore); 10 μ M de inibidor de β -hexosaminidase (376820; EMD Millipore); 0,1 mM PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonila); para o ensaio da atividade da OGT, ainda foram adicionados na

solução tampão 0,5 μ M de TMG (SD ChemMolecules LLC). Seguimentos arteriais preservados à -70 °C, foram homogeneizados em homogeneizador por agitação Retsch MM 400 (Verder Scientific, Newton, PA) utilizando uma esfera de metal com 5 mm de diâmetro, frequência de 25 Hz, por 45 s; o procedimento foi repetido uma vez. As amostras foram então trituradas em solução tampão HEPES com homogeneizador Omni TIP (Omni International, Kennesaw, GA), 2 vezes por 30 segundos. A fração solúvel foi separada após centrifugação à 17.000 g (30 minutos à 4 °C). A concentração protéica foi estimada pela reação com ácido bicinonínico (BCA), leitura a 562 nm. As amostras foram normalizadas e então os ensaios de atividade foram iniciados.

3.6.1 Atividade enzimática da OGA

Frações solúveis das amostras, de iguais concentrações, foram usadas para a realização dos experimentos. A atividade da OGA foi quantificada em duplicata com o substrato fluorescente 4MU-GlcNAc ou 4MU-GalNAc 1 mM (Sigma-Aldrich Inc., EUA), GalNAc 100 mM (Sigma-Aldrich Inc., EUA) e solução tampão para OGA [cocadilato de sódio 100 mM, pH 6.4, 0,3% (massa/volume) de soro fetal bovino] em placas de 96 poços de laterais negras e fundo transparente (KIM, D. I. et al., 2014). β -N-acetilhexosaminidase_r (New England Biolabs, Ipswich, MA) diluída em HEPES 25 mM foi usada como controle positivo (5 unidades por poço). A reação foi incubada por 4 h a 37 °C, protegida da luz, e então bloqueada com glicina 200 mM, pH 10.75 (concentração final 150 mM, em 50 μ L de reação), e a intensidade da fluorescência foi medida utilizando a leitora de microplacas Synergy HT (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT; excitação 368 nm e emissão 450 nm). A atividade da OGA foi normalizada pela subtração da fluorescência resultante da contaminação por hexosaminidases lisossomais (a atividade dessas enzimas contaminantes foi quantificada utilizando-se o reagente 4MU-GalNAc) (KIM, D. I. et al., 2014). A atividade foi convertida em pmoles/min/mg usando uma curva padrão de 4MU livre.

3.6.2 Atividade enzimática da OGT

Em placas de 96 poços, de fundo claro e redondo, amostras de iguais concentrações foram incubadas (por 4 h, a 25 °C) em triplicatas com 0,5 µCi de [³H]UDP-GlcNAc (ART 0128; American Radiolabeled Chemicals, St. Louis, MO; specific activity, 60 Ci/mmol), 1 mM de receptor de peptídeos, caseína cinase (CKII – PGGSTPVSSANMM; The Johns Hopkins University School of Medicine Synthesis and Sequencing Facility), 2,5 unidades de fosfatase alcalina de intestino bovino (New England Biolabs), 0,25 mM de 5'-AMP (Sigma-Aldrich Inc., EUA), e solução tampão para OGT. A enzima recombinante His6-OGT foi purificada em agarose ácida de nitrilotriacetato de níquel (Qiagen, Venlo, The Netherlands), diluída em HEPES 25 mM, e usada como controle positivo (0,5 µg/poço). A reação foi interrompida com solução de ácido fórmico 37,5 mM e NaCl 750 mM (concentração final na reação de 50 µL). As amostras foram colocadas em uma placa de 96 poços StrataC18 (25 mg/poço; 8E-S001-CGB; Phenomenex), ativada com metanol 100% e equilibrada em solução de ácido fórmico 50 mM e NaCl 1 M, seguido de água e então ácido fórmico 50 mM (2 mL cada poço, duas vezes cada solução). As amostras foram aplicadas e então a placa C18 foi lavada com ácido fórmico 50 mM e NaCl 1 M, água e ácido fórmico 50 mM (2 mL cada poço, duas vezes cada solução). O produto da reação foi extraído da coluna com metanol 100% (2 mL), e a incorporação do GlcNAc foi quantificada por líquido de contagem cintilográfica (Beckman Coulter Inc., Indianapolis, IN). A atividade foi normalizada pela subtração da contagem média da triplicata incubada com e sem peptídeo CKII. Contagem/min foi convertida em desintegrações/min usando a curva padrão do [³H]UDP-GlcNAc, e então para fentomoles/min/mg.

3.7 Western blotting

SDS-Page foi realizado usando géis de poliacrilamida Tris-glicina (TGX, Bio-Rad; Novex, Life Technologies, Inc.). Volumes iguais das amostras, nas mesmas concentrações foram colocados no gel. Proteínas foram eletrotransferidas para membranas de nitrocelulose (0,45 µm; Bio-Rad). As membranas foram bloqueadas em leite desnatado 3% (massa/volume), diluído em TBS-T [0,05% (volume/volume) Tween20; 1 h, 25 °C], incubadas em anticorpo primário (16-20 h, 4 °C) e então incubadas com anticorpos secundários conjugados-HRP (1 h, 25 °C). As

membranas foram reveladas usando Immobilon Western Chemiluminescent Substrate (EMD Millipore) e as imagens adquiridas em filme radiográfico ou pela fotodocumentadora Amersham Bioscience Imager 600 RGB (GE Health-care). As membranas foram incubadas com PBS com azido de sódio, 0,1% (massa/volume), por 10 minutos a 25 °C, e então lavadas em glicina 200 mM, pH 2.5 (1 h, 25 °C) e então anticorpos primários para proteínas de diferentes pesos moleculares foram incubados. A quantidade de proteína nas membranas foi estimada por proteína HSC 70, ou corante de membrana para proteínas totais (Sypro Ruby; Bio-Rad). A quantificação das bandas proteicas e do total de proteínas coradas foi feita pelo software ImageJ (versão 2.0.0; National Institute of Health, Bethesda, MD). A quantificação foi realizada nas bandas proteicas individuais, exceto pelo O-GlcNAc e a coloração para proteínas totais, quando a quantificação foi realizada em toda a coluna. As diluições dos anticorpos utilizados nesse estudo estão demonstradas na tabela 1.

Tabela 3.7.1 – Lista de anticorpos primários e seus respectivos anticorpos secundários.

Anticorpo primário (Diluição)	Anticorpo secundário (Diluição)	Companhia
GFAT-1/GFPT-1 (1/1000)	Coelho (1/2000)	Abcam Inc., EUA (Ab125069)
OGT-DM17 (1/1000)	Coelho (1/5000)	Sigma-Aldrich Inc., EUA (O6264)
OGA-345A (1/5000)	Galinha (1/5000)	Produzido no laboratório da Dra. Natasha E. Zachara (lote: 345A)
O-GlcNAc/CTD110.6 (1/1000)	α -IgM (1/5000)	Produzido no laboratório da Dra. Natasha E. Zachara (lote: 110.6 A 07/22/2016)
HSC 70 (1/5000)	Camundongo (1/5000)	Santa Cruz Biotechnology Inc, EUA (sc-7298)
GAPDH humano (1/2000)	Coelho (1/2000)	Sigma-Aldrich Inc., EUA (G9545)

3.8 Análise Estatística

Cada grupo de dados foi analisado quanto a presença de *outliers* pelo teste ROUT e $Q = 1\%$. Quando identificados, os mesmos foram retirados da análise estatística. Subsequentemente, foram analisados quanto a distribuição Gaussiana dos dados com o teste de normalidade de D'Agostino-Pearson. A significância estatística dos dados com distribuição normal foi determinada por meio do teste “t”

de uma amostra e o valor de P foi calculado pela razão “t” e pelos graus de liberdade, ou teste de variância (ANOVA *one way*) seguido do pós-teste de Newman-Keuls. A significância estatística dos dados com distribuição não paramétrica foi determinada por meio do teste de Mann-Whitney (descrito pelos valores de P e U) ou pelo teste de Kruskal-Wallis (descrito pelo valor de P e pelo valor da estatística Kruskal-Wallis – KW) e pós-teste de Dunn (descrito pelo valor de D, quando o valor de $\alpha = 0,05$). Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). As curvas concentração-efeito para os agonistas foram submetidas à análise de regressão não-linear [log (agonista) vs. resposta]. Toda a análise gráfica e estatística foi realizada com o programa Prisma (GraphPad Prism 6.0, GraphPad Software Incorporated, CA). A potência dos agonistas e a resposta máxima foram expressas como pD_2 (logaritmo negativo da concentração molar que produz 50% da resposta máxima) e $E_{m\acute{a}x}$ (máximo efeito produzido pelo agonista), respectivamente.

4 RESULTADOS

4.1 Presença dos componentes da via de biossíntese das hexosaminas em artérias de humanos do grupo Controle

Na primeira parte do estudo, buscamos identificar a presença dos principais componentes da VBH em artérias mesentéricas humanas do grupo Controle, subgrupo Após Isolamento: GFAT, a enzima limitante da via; OGT e OGA, as enzimas responsáveis pela adição de UDP-GlcNAc e remoção de GlcNAc das proteínas, respectivamente.

Na Figura 4.1.1 encontram-se fotografias representativas de membranas de western blots, onde identificamos, em artérias mesentéricas de resistência (amostra T78), a presença de OGA com peso molecular 130 kDa (A). Em (B), OGT com peso molecular 115 kDa e a presença de uma segunda banda que, segundo dados da literatura, corresponde à OGT mitocondrial (mOGT) com peso de 103 kDa (HANOVER et al., 2003) e que é fortemente marcada devido à grande quantidade de mitocôndrias presente no músculo liso vascular arterial.

Figura 4.1.1 – Identificação dos componentes da Via de Biossíntese das Hexosaminas. Ensaio de Western blotting realizados em artérias mesentéricas do grupo Controle, subgrupo Após Isolamento, para a identificação das principais proteínas da VBH. (A), Identificação da enzima OGA; (B), Identificação da enzima OGT.

A capacidade das drogas TMG e PUGNAc de inibir a OGA foi testada por meio do ensaio de quantificação da atividade enzimática de OGA (Figura 4.1.2). Observamos que o tratamento com TMG a 100 μ M por 24 h foi eficaz na inibição da atividade enzimática de OGA. O tratamento com PUGNAc a 10 μ M por 24 h não inibiu a atividade de OGA, e este grupo não apresentou diferença significativa em relação ao subgrupo Após Isolamento, como observado no subgrupo Thiamet G 100 μ M, quando comparado ao subgrupo Após Isolamento.

Frente aos resultados obtidos e a avaliação da efetividade do TMG em inibir a atividade de OGA, passamos ao próximo passo, onde avaliamos se os tratamentos com as duas drogas alteram a expressão dos componentes da VBH. Mesmo não apresentando efeito significativo no teste enzimático, optamos por manter o tratamento com PUGNAc devido ao seu extenso uso na literatura e para comparar as respostas às duas drogas.

Figura 4.1.2 – Efeito de TMG e PUGNAc sobre a atividade enzimática de OGA no grupo Controle. Ensaio que avalia a atividade enzimática de OGA. O tratamento feito com TMG 100 µM por 24 h reduziu a atividade enzimática de OGA. Este efeito não foi observado com PUGNAc 10 µM por 24 h. Os valores foram calculados relativamente ao subgrupo Após Isolamento, cujo valor da média foi, arbitrariamente, definido como 1. A significância dos dados foi determinada pelo teste ANOVA não-paramétrico de Kruskal-Wallis ($p = 0,009$; estatística de Kruskal-Wallis = 9,4), seguido do pós-teste de Dunn para comparações múltiplas em relação ao controle ($D = 9,8$).

4.2 Tratamento com Thiamet G ou PUGNAc e a expressão dos componentes da VBH em artérias do grupo Controle

Para analisarmos os efeitos das drogas no tecido arterial, inicialmente utilizamos apenas pacientes do grupo Controle e os separamos em subgrupos onde as artérias foram submetidas a incubação com TMG 100 µM ou PUGNAc 10 µM por 24 h. Definimos arbitrariamente a resposta obtida no subgrupo Após Isolamento como valor 1 para facilitar a comparação das repostas às drogas estudadas e os resultados são apresentados como “variação em relação ao subgrupo Após Isolamento”. Notamos aumento dos níveis de proteínas modificadas por O-GlcNAc nos dois subgrupos. No entanto, o aumento foi mais evidente e significativamente diferente apenas nas amostras submetidas ao tratamento com TMG, como podemos observar na Figura 4.2.1.

Figura 4.2.1 – Influência de TMG e PUGNac nos níveis de proteínas modificadas por O-GlcNAc em artérias mesentéricas do grupo Controle. Ensaio de western blotting foi realizado em artérias mesentéricas do grupo Controle, nos três subgrupos: Após Isolamento, Thiamet G 100 μ M e PUGNac 10 μ M. (A), western blotting para proteínas modificadas por O-GlcNAc nas diferentes condições experimentais; (B), carga de proteínas totais nas diferentes condições experimentais; (C), quantificação de proteínas modificadas por O-GlcNAc nas diferentes condições experimentais. Os valores foram calculados relativamente ao subgrupo Após Isolamento, cujo valor da média foi, arbitrariamente, definido como 1. A significância dos dados foi determinada pelo teste ANOVA não-paramétrico de Kruskal-Wallis ($p = 0,003$; estatística de Kruskal-Wallis = 9,3), seguido do pós-teste de Dunn para comparações múltiplas ($D = -8,6$).

Na etapa seguinte avaliamos a expressão de OGA. Observamos aumento significativo da expressão protéica de OGA frente ao tratamento com as duas drogas, Figura 4.2.2. Apesar de não termos observado diferenças significativas na alteração da atividade enzimática de OGA, ou no aumento dos níveis de proteínas modificadas por O-GlcNAc, com o uso de PUGNac, observamos que esta droga promoveu aumento da expressão de OGA. Com relação à OGT, não observamos alterações estatisticamente significativas da expressão desta enzima para nenhuma das drogas utilizadas, Figura 4.2.3.

Figura 4.2.2 – Influência de TMG e PUGNac na expressão de OGA em artérias mesentéricas do grupo Controle. Ensaio de Western blotting foi realizado em artérias mesentéricas do grupo Controle nos três subgrupos: Após Isolamento, Thiamet G 100 μ M e PUGNac 10 μ M. (A), western blotting para OGA nas diferentes condições experimentais; (B), carga de proteínas totais nas diferentes condições experimentais; (C), quantificação de OGA nas diferentes condições experimentais. Os valores foram calculados relativamente ao subgrupo Após Isolamento, cujo valor da média foi, arbitrariamente, definido como 1. A significância dos dados foi determinada pelo teste ANOVA não-paramétrico de Kruskal-Wallis ($p = 0,001$; estatística de Kruskal-Wallis = 10,5), seguido do pós-teste de Dunn para comparações múltiplas ($D = -9,2$ para Thiamet G e $D = -8,6$ para PUGNac).

Figura 4.2.3 – Influência de TMG e PUGNAc na expressão de OGT em artérias mesentéricas do grupo Controle. Ensaio de Western blotting foi realizado em artérias mesentéricas do grupo Controle nos três subgrupos: Após Isolamento, Thiamet G 100 µM e PUGNAc 10 µM. (A), western blotting para OGT nas diferentes condições experimentais; (B), carga de proteínas totais nas diferentes condições experimentais; (C), quantificação de OGT nas diferentes condições experimentais. Os valores foram calculados relativamente ao subgrupo Após Isolamento, cujo valor da média foi, arbitrariamente, definido como 1. Não foram observadas diferenças significativas entre os dados após teste ANOVA não-paramétrico de Kruskal-Wallis ($p = 0,2$; estatística de Kruskal-Wallis = 3,3).

Os dados obtidos nas Figuras 4.2.1, 4.2.2 e 4.2.3 mostram que tanto TMG como PUGNAc produziram alterações em componentes da VBH em CMLVs de artérias mesentéricas de humanos do grupo Controle. Na etapa seguinte avaliamos se artérias de pacientes hipertensos apresentavam respostas semelhantes àquelas observadas no grupo Controle, submetidos aos tratamentos.

4.3 Tratamento com Thiamet G ou PUGNAc e a expressão dos componentes da VBH em artérias do grupo Hipertenso

Para avaliarmos os efeitos de TMG e PUGNAc sobre as CMLVs dos pacientes do grupo Hipertenso comparamos estatisticamente seus três subgrupos: Após Isolamento, Thiamet G 100 µM e PUGNAc 10 µM. Para a composição dos gráficos, os valores foram calculados relativamente ao subgrupo Após Isolamento do grupo Controle, cujo valor foi, arbitrariamente, definido como 1. Possíveis diferenças basais na expressão de componentes da VBH entre os grupos Controle e Hipertenso serão apresentadas na seção 4.4.

Figura 4.3.1 – Influência de TMG e PUGNac nos níveis de proteínas modificadas por O-GlcNAc em artérias mesentéricas do grupo Hipertenso. Ensaio de Western blotting foram realizados em artérias mesentéricas do grupo Hipertenso nos três subgrupos: Após Isolamento, Thiamet G 100 μ M e PUGNac 10 μ M. (A), western blotting para proteínas modificadas por O-GlcNAc nas diferentes condições experimentais; (B), carga de proteínas totais nas diferentes condições experimentais; (C), quantificação de proteínas modificadas por O-GlcNAc nas diferentes condições experimentais. Os valores foram calculados relativamente ao subgrupo Após Isolamento do grupo Controle, cujo valor foi, arbitrariamente, definido como 1. Análise estatística feita apenas entre os três subgrupos do grupo Hipertenso. Não foram observadas diferenças significativas entre os dados após teste ANOVA não-paramétrico de Kruskal-Wallis ($p = 0,35$; estatística de Kruskal-Wallis = 2,2).

Observamos que o tratamento das artérias mesentéricas do grupo Hipertenso com TMG e PUGNac induziu um discreto, mas não significativo, aumento dos níveis de proteínas modificadas por O-GlcNAc, quando comparado ao subgrupo Após Isolamento do mesmo grupo (Figura 4.3.1). A expressão de OGA aumentou significativamente após tratamento com TMG, enquanto que PUGNac não induziu nenhuma alteração na expressão dessa proteína (Figura 4.3.2). Não foram observadas alterações na expressão de OGT em resposta a nenhuma das drogas, Figura 4.3.3.

Figura 4.3.2 – Influência de TMG e PUGNac na expressão de OGA em artérias mesentéricas do grupo Hipertenso. Ensaios de Western blotting foram realizados em artérias mesentéricas do grupo Hipertenso nos três subgrupos: Após Isolamento, Thiamet G 100 μ M e PUGNac 10 μ M. (A), western blotting para proteínas modificadas por OGA nas diferentes condições experimentais; (B), carga de proteínas totais nas diferentes condições experimentais; (C), quantificação de OGA nas diferentes condições experimentais. Os valores foram calculados relativamente ao subgrupo Após Isolamento do grupo Controle, cujo valor foi, arbitrariamente, definido como 1. Análise estatística feita apenas entre os três subgrupos do grupo Hipertenso. A significância dos dados foi determinada pelo teste ANOVA não-paramétrico de Kruskal-Wallis ($p = 0,01$; estatística de Kruskal-Wallis = 7,4), seguido do pós-teste de Dunn para comparações múltiplas ($D = -7,6$).

Figura 4.3.3 – Influência de TMG e PUGNac na expressão de OGT em artérias mesentéricas do grupo Hipertenso. Ensaios de Western blotting foram realizados em artérias mesentéricas do grupo Hipertenso nos três subgrupos: Após Isolamento, Thiamet G 100 μ M e PUGNac 10 μ M. (A), western blotting para proteínas modificadas por OGT nas diferentes condições experimentais; (B), carga de proteínas totais nas diferentes condições experimentais; (C), quantificação de OGT nas diferentes condições experimentais. Os valores foram calculados relativamente ao subgrupo Após Isolamento do grupo Controle, cujo valor foi, arbitrariamente, definido como 1. Análise estatística feita apenas entre os três subgrupos do grupo Hipertenso. Não foram observadas diferenças significativas entre os dados após teste ANOVA não-paramétrico de Kruskal-Wallis ($p = 0,37$; estatística de Kruskal-Wallis = 2,0).

Na próxima etapa, testamos a capacidade das drogas TMG e PUGNac de inibir OGA no grupo Hipertenso por meio do ensaio de quantificação da atividade enzimática de OGA (Figura 4.3.4). Observamos que o tratamento com TMG 100 μ M por 24 h não produziu inibição significativa da atividade enzimática de OGA. Também não foi identificado efeito significativo com o uso de PUGNac, a 10 μ M por 24 h, em relação ao subgrupo Após Isolamento do grupo Hipertenso.

Figura 4.3.4 – Efeito de TMG e PUGNAc sobre a atividade enzimática de OGA no grupo Hipertenso. Ensaio que avalia a atividade enzimática de OGA. Os tratamentos feitos com TMG 100 μ M e PUGNAc 10 μ M por 24 h não reduziram a atividade enzimática de OGA significativamente. Os valores foram calculados relativamente ao subgrupo Após Isolamento do grupo Controle, cujo valor da média foi, arbitrariamente, definido como 1. Análise estatística feita apenas entre os três subgrupos do grupo Hipertenso. Não foram observadas diferenças significativas entre os dados após teste ANOVA não-paramétrico de Kruskal-Wallis ($p = 0,69$; estatística de Kruskal-Wallis = 0,8).

4.4 Diferenças nas respostas ao tratamento com Thiamet G e PUGNAc entre os grupos Controle e Hipertenso

A indicação pelos resultados de possíveis diferenças entre as respostas dos grupos Controle e Hipertenso ao tratamento com as duas drogas nos direcionaram a comparar essas respostas isoladamente para cada subgrupo estudado: Após Isolamento, Thiamet G 100 μ M e PUGNAc 10 μ M. Apesar da clara tendência de menores níveis de proteínas modificadas por O-GlcNAc e de menor expressão de OGA em artérias mesentéricas do grupo Hipertenso em relação ao grupo Controle nos subgrupos Após Isolamento, não houve diferença estatisticamente significativa nestas variáveis - níveis de proteínas modificadas por O-GlcNAc, expressão de OGA ou expressão de OGT - em condições basais (Figura 4.4.1).

Figura 4.4.1 – Comparação da expressão dos componentes da VBH entre os grupos Controle e Hipertenso, subgrupos Após Isolamento. Ensaios de Western blotting foram realizados em artérias mesentéricas dos grupos Controle e Hipertenso, subgrupos Após Isolamento. (A), quantificação de proteínas modificadas por O-GlcNAc em relação ao grupo Controle; (B), expressão de OGA em relação ao grupo Controle; (C), expressão de OGT em relação ao grupo Controle. Os valores foram calculados em relação ao subgrupo Após Isolamento do grupo Controle, considerado como valor arbitrário 1. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os dados após teste de Mann-Whitney ($p = 0,2$ e $U = 5$; $p = 0,2$ e $U = 5$; $p = 0,99$ e $U = 10$; respectivamente O-GlcNAc, OGA e OGT).

Possíveis diferenças na expressão dos componentes da VBH entre artérias dos grupos Controle e Hipertenso também foram analisadas após tratamento com TMG (Figura 4.4.2) e PUGNAc (Figura 4.4.3).

Figura 4.4.2 – Comparação dos efeitos de TMG na expressão dos componentes da VBH em artérias dos grupos Controle e Hipertenso, subgrupo Thiamet G 100 μ M. Ensaios de Western blotting foram realizados em artérias mesentéricas dos grupos Controle e Hipertenso após tratamento com TMG 100 μ M. (A), quantificação de proteínas modificadas por O-GlcNAc em relação ao subgrupo Após Isolamento do grupo Controle; (B), expressão de OGA em relação ao subgrupo Após Isolamento do grupo Controle; (C), expressão de OGT em relação ao subgrupo Após Isolamento do grupo Controle. Os valores foram calculados em relação aos resultados do subgrupo Após Isolamento do grupo Controle, cujo valor foi, arbitrariamente, definido como 1. Análise estatística feita apenas entre os dois subgrupos Thiamet G 100 μ M. A significância dos dados foi determinada pelo teste de Mann-Whitney ($p = 0,003$ e $U = 9,3$ e $D = -7,7$ para A; $p = 0,6$ e $U = 16$ para B; $p = 0,3$ e $U = 2,1$ para C).

Figura 4.4.3 – Comparação dos efeitos de PUGNAC na expressão dos componentes da VBH em artérias dos grupos Controle e Hipertenso, subgrupo PUGNAC 10 μ M. Ensaios de Western blotting foram realizados em artérias mesentéricas dos grupos Controle e Hipertenso após tratamento com PUGNAC 10 μ M. (A), quantificação de proteínas modificadas por O-GlcNAc em relação ao subgrupo Após Isolamento do grupo Controle; (B), expressão de OGA em relação ao subgrupo Após Isolamento do grupo Controle; (C), expressão de OGT em relação ao subgrupo Após Isolamento do grupo Controle. Os valores foram calculados em relação aos resultados do subgrupo Após Isolamento do grupo Controle, cujo valor foi, arbitrariamente, definido como 1. Análise estatística feita apenas entre os dois subgrupos PUGNAC 10 μ M. A significância dos dados foi determinada pelo teste de Mann-Whitney ($p = 0,6$ e $U = 10$ para A; $p = 0,03$ e $U = 2$ para B; $p = 0,07$ e $U = 6$ para C).

Ao analisarmos a atividade enzimática de OGA (Figura 4.4.4) não observamos diferenças significativas na atividade desta enzima entre os subgrupos Após Isolamento dos grupos Controle e Hipertenso (Figura 4.4.4 A). O mesmo ocorreu na atividade enzimática de OGT (Figura 4.4.5 A). Ao compararmos as respostas de cada grupo ao tratamento com TMG, subgrupos Thiamet G 100 μ M, observamos redução significativa da atividade de OGA no grupo Controle, o que não ocorreu no grupo Hipertenso (Figura 4.4.4 B). O tratamento com PUGNAc, subgrupos PUGNAc 10 μ M, não alterou a atividade enzimática em nenhum dos grupos (Figura 4.4.4 C). A atividade de OGT não sofreu alterações após tratamento com nenhuma das drogas (Figura 4.4.5 B e C).

Figura 4.4.4 – Comparação da atividade de OGA entre os grupos Controle e Hipertenso antes e após tratamento com TMG ou PUGNAc. (A), atividade enzimática de OGA no subgrupo Após Isolamento; (B), atividade enzimática de OGA no subgrupo Thiamet G 100 μ M; (C), atividade enzimática de OGA no subgrupo PUGNAc 10 μ M. Os valores foram calculados em relação aos resultados do subgrupo Após Isolamento do grupo Controle, cujo valor foi, arbitrariamente, definido como 1. Em (A), não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os dados após teste de Mann-Whitney ($p = 0,5$ e $U = 11$); em (B) não foram observadas diferenças significativas Thiamet G 100 μ M (g. Controle) vs. Thiamet G 100 μ M (g. Hipertenso) e (C) não foram observadas diferenças significativas entre PUGNAc 10 μ M (g. Controle) vs. PUGNAc 10 μ M (g. Hipertenso), realizado teste ANOVA não-paramétrico de Kruskal-Wallis ($p = 0,66$; estatística de Kruskal-Wallis = 1,0 para B; $p = 0,36$; estatística de Kruskal-Wallis = 2,1 para C).

Figura 4.4.5 – Comparação da atividade de OGT entre os grupos Controle e Hipertenso antes e após tratamento com TMG ou PUGNAC. (A), atividade enzimática de OGT no subgrupo Após Isolamento; (B), atividade enzimática de OGT no subgrupo Thiamet G 100 μ M; (C), atividade enzimática de OGT no subgrupo PUGNAC 10 μ M. Os valores foram calculados em relação aos resultados do subgrupo Após Isolamento do grupo Controle, cujo valor foi, arbitrariamente, definido como 1. Foi realizado o teste de Mann-Whitney entre os grupos Controle e Hipertenso. Em (A), não foi observado significância dos dados após teste de Mann-Whitney ($p = 0,9$ e $U = 14$); em (B) não foram observadas diferenças significativas entre Thiamet G 100 μ M (g. Controle) vs. Thiamet G 100 μ M (g. Hipertenso) e (C) não foram observadas diferenças significativas entre PUGNAC 10 μ M (g. Controle) vs. PUGNAC 10 μ M (g. Hipertenso), realizado teste ANOVA não-paramétrico de Kruskal-Wallis ($p = 0,82$; estatística de Kruskal-Wallis = 0,9 para B; $p = 0,79$; estatística de Kruskal-Wallis = 1,0 para C).

Os resultados acima nos permitiram identificar uma importante diferença entre os dois grupos. No grupo Hipertenso, TMG não foi capaz de reduzir a atividade de OGA (Figura 4.4.4 B), o que justificaria não termos observado aumento dos níveis de proteínas modificadas por O-GlcNAc (Figura 4.3.1).

4.5 Tratamento com Thiamet G não altera a geração de EROs nos grupos Controle e Hipertenso

Avaliamos também que o tratamento com TMG não alterou a geração de EROs em nenhum dos grupos estudados (Figura 4.5.1 e Figura 4.5.2), assim como não observamos diferenças significativas nos níveis de EROs ao compararmos seus respectivos subgrupos (Após Isolamento e Thiamet G 100 μ M), Figura 4.5.3.

Figura 4.5.1 – Geração de EROs no grupo Controle, antes e após tratamento com TMG. Fluorescência por di-hidroetídio determinada em artérias mesentéricas do grupo Controle. Gráfico demonstra a quantificação da geração de EROs no grupo Controle, antes e após tratamento com TMG 100 µM. Os valores foram calculados relativamente ao subgrupo Após Isolamento, cujo valor da média foi, arbitrariamente, definido como 1. Não foi observada diferença significativa entre os dados pelo teste de Mann-Whitney ($p = 0,11$ e $U = 3$).

Figura 4.5.2 – Geração de EROs no grupo Hipertenso, antes e após tratamento com TMG. Fluorescência por di-hidroetídio determinada em artérias mesentéricas do grupo Hipertenso. Gráfico demonstra a quantificação da geração de EROs no grupo Hipertenso antes e após tratamento com TMG 100 µM. Os valores foram calculados relativamente ao subgrupo Após Isolamento do grupo Hipertenso, cujo valor da média foi, arbitrariamente, definido como 1. Não foi observada diferença significativa entre os dados após teste de Mann-Whitney ($p = 0,9$ e $U = 8$).

Figura 4.5.3 – Comparação da geração de EROs entre os grupos Controle e Hipertenso. Fluorescência por di-hidroetídio determinada em artérias mesentéricas dos grupos Controle e Hipertenso. (A), quantificação da geração de EROs nos grupos Controle e Hipertenso, subgrupo Após Isolamento; (B), quantificação da geração de EROs nos grupos Controle e Hipertenso, subgrupo Thiamet G 100 µM por 24 h. Os valores foram calculados relativamente ao subgrupo Após Isolamento de cada grupo, cujo valor da média foi, arbitrariamente, definido como 1. Não foram observadas diferenças significativas entre os dados após teste Mann-Whitney ($p = 0,24$ e $U = 8$ para A; $p = 0,62$ e $U = 4$ para B).

Os resultados dos experimentos moleculares descritos acima foram apresentados usando como referência o subgrupo Após Isolamento do grupo Controle.

4.6 Alterações na função vascular dos grupos Controle e Hipertenso após tratamento com Thiamet G

Na etapa seguinte avaliamos se as alterações observadas na VBH se refletem em alterações funcionais arteriais dos grupos Controle e Hipertenso. A seguir, apresentamos apenas os resultados referentes a TMG 100 µM, em função dos resultados mais claros observados com esta droga, como apresentado nas seções anteriores.

Inicialmente, avaliamos o efeito do tratamento com TMG e seu diluente DMSO (Veículo) na contratilidade arterial mediada por noradrenalina (NA). Consideramos o momento Após Isolamento como uma situação onde os anéis arteriais estão submetidos a grande estresse devido à manipulação e ao intervalo de tempo entre a ressecção cirúrgica e o experimento. Após 24 h de incubação com

veículo, o grupo Controle apresentou redução significativa do pD_2 à NA ($p = 0,004$ e $U = 4$). O tratamento com TMG promoveu aumento da resposta contrátil a NA, com as artérias apresentando padrão de resposta similar ao observado no subgrupo Após Isolamento, mas sem diferença significativa para os valores de pD_2 ($p = 0,09$ e $U = 13$), Figura 4.6.1 A e B e Tabela 4.6.1.

Figura 4.6.1 – Influência do TMG na resposta vascular contrátil à noradrenalina no grupo Controle. Curvas concentração-resposta à noradrenalina em artérias mesentéricas de pacientes do grupo Controle. (A), Curvas concentração-resposta à noradrenalina imediatamente após dissecação e isolamento do anel arterial (subgrupo Após Isolamento) e após incubação por 24 h com Veículo; (B), Curvas concentração-resposta à noradrenalina após incubação por 24 h com Veículo ou TMG 100 μ M. Os valores experimentais de contração foram calculados em relação à resposta contrátil máxima por KCl (120 mM), considerada 100%. Os resultados são apresentados como média $\pm$ EPM de cada grupo experimental, # $p < 0,05$ vs. subgrupo Após Isolamento (A). A significância dos dados foi determinada por meio do teste de Mann-Whitney. # referente a diferença significativa em pD_2 .

No próximo passo avaliamos o relaxamento vascular mediado por nitroprussiato de sódio (NPS). Observamos que, após incubação com Veículo, as artérias do grupo Controle apresentaram redução significativa no $E_{m\acute{a}x}$ ($p = 0,03$ e $U = 0$). Após tratamento com TMG, as artérias apresentaram aumento significativo do pD_2 ($p = 0,01$ e $U = 1$) e da $E_{m\acute{a}x}$ ($p = 0,006$ e $U = 0$), com maior relaxamento à droga, Figura 4.6.2 e Tabela 4.6.1.

Figura 4.6.2 – Influência do TMG na resposta vascular de relaxamento ao nitroprussiato de sódio no grupo Controle. (A), Curvas concentração-resposta ao nitroprussiato de sódio imediatamente após dissecação e isolamento do anel arterial (subgrupo Após Isolamento) e após incubação por 24 h com Veículo; (B), Curvas concentração-resposta ao nitroprussiato de sódio após incubação por 24 h com Veículo ou TMG 100 µM. Os valores experimentais de relaxamento foram calculados em relação à resposta contrátil máxima por KCl (120 mM), considerada 100%. Os resultados são apresentados como média $\pm$ EPM de cada grupo experimental, * $p < 0,05$ vs. subgrupo Após Isolamento em (A); * $p < 0,05$ vs. subgrupo Veículo e # $p < 0,05$ vs. subgrupo Veículo em (B). A significância dos dados foi determinada por meio do teste de Mann-Whitney. * referente a diferença significativa na $E_{\max}$ e # referente a diferença significativa na pD_2 .

Tabela 4.6.1 – Valores de $E_{\max}$ e pD_2 para noradrenalina e nitroprussiato de sódio em segmentos de artéria mesentérica de pacientes do grupo Controle.

	$E_{\max}$ (% KCl 120 mM)	pD_2
Noradrenalina		
Após Isolamento (N = 7)	119,8 $\pm$ 5,7	6,1 $\pm$ 0,3
Veículo (N = 8)	107,8 $\pm$ 7,4	5,0 $\pm$ 0,2 ‡
Thiamet G 100 µM (N = 7)	132 $\pm$ 9,6	5,5 $\pm$ 0,1
Nitroprussiato de Sódio		
Após Isolamento (N = 4)	123,3 $\pm$ 11,5	7,3 $\pm$ 0,5
Veículo (N = 4)	85,6 $\pm$ 6,3 ‡	6,6 $\pm$ 0,3
Thiamet G 100 µM (N = 7)	137,1 $\pm$ 8,4 §	7,5 $\pm$ 0,1 §

Resultados referentes às Figuras 4.6.1 e 4.6.2. Os dados são apresentados como média $\pm$ EPM de cada subgrupo. Os valores experimentais de contração e relaxamento foram calculados em relação à resposta contrátil produzida pelo KCl (120 mM), que foi considerada 100%. ‡ $p < 0,05$ vs. Após isolamento, § $p < 0,05$ vs. Veículo. A significância dos dados foi determinada por meio do teste de Mann-Whitney.

Realizamos então os mesmos experimentos com artérias do grupo Hipertenso e observamos um padrão de resposta diferente daquele apresentado pelo grupo Controle. A incubação com Veículo e TMG não alterou a resposta de contração mediada por NA, Figura 4.6.3 A e B e Tabela 4.6.2.

Figura 4.6.3 – Influência do TMG na resposta vascular contrátil à noradrenalina no grupo Hipertenso.. (A), Curvas concentração-resposta à noradrenalina imediatamente após dissecação e isolamento do anel arterial (subgrupo Após Isolamento) e após incubação por 24 h com Veículo; (B), Curvas concentração-resposta à noradrenalina após incubação por 24 h com Veículo ou TMG 100 µM. Os valores experimentais de contração foram calculados em relação à resposta contrátil máxima por KCl (120 mM), considerada 100%. Os resultados são apresentados como média ± EPM de cada grupo experimental. A significância dos dados foi determinada por meio do teste de Mann-Whitney.

Ao analisarmos a resposta do grupo Hipertenso ao NPS, não observamos nenhuma diferença no relaxamento após incubação com Veículo. Após tratamento com TMG, observamos redução dos valores de pD_2 ($P = 0,0571$ e $U = 0$) e da $E_{máx}$ ($P = 0,0571$ e $U = 0$), no entanto sem diferença estatística (Figura 4.6.4 A e B e Tabela 4.6.2)

Figura 4.6.4 – Influência do TMG na resposta vascular de relaxamento ao nitroprussiato de sódio no grupo Hipertenso. (A), Curvas concentração-resposta ao nitroprussiato de sódio imediatamente após dissecação e isolamento do anel arterial (subgrupo Após Isolamento) e após incubação por 24 h com Veículo; (B), Curvas concentração-resposta ao nitroprussiato de sódio após incubação por 24 h com Veículo ou TMG 100 µM. Os valores experimentais de relaxamento foram calculados em relação à resposta contrátil máxima por KCl (120 mM), considerada 100%. Os resultados são apresentados como média ± EPM de cada grupo experimental. A significância dos dados foi determinada por meio do teste de Mann-Whitney.

Tabela 4.6.2 – Valores de $E_{\text{máx}}$ e pD_2 para noradrenalina e nitroprussiato de sódio em segmentos de artéria mesentérica de pacientes do grupo Hipertenso.

	$E_{\text{máx}}$ (% KCl 120 mM)	pD_2
Noradrenalina		
Após Isolamento (N = 6)	120,3 ± 7,9	5,1 ± 0,3
Veículo (N = 5)	103,7 ± 2,2	5,5 ± 0,1
Thiamet G 100 μ M (N = 5)	97,65 ± 4,2	5,5 ± 0,1
Nitroprussiato de Sódio		
Após Isolamento (N = 3)	114,1 ± 8,8	7,8 ± 0,8
Veículo (N = 3)	143,9 ± 9,9	13,85 ± 7,3
Thiamet G 100 μ M (N = 4)	92,1 ± 2,2	5,557 ± 0,1

Resultados referentes às Figuras 4.6.3 e 4.6.4. Os dados são apresentados como média $\pm$ EPM de cada subgrupo. Os valores experimentais de contração e relaxamento foram calculados em relação à resposta contrátil produzida pelo KCl (120 mM), que foi considerada 100%. A significância dos dados foi determinada por meio do teste de Mann-Whitney.

Em seguida, comparamos as respostas contráteis e de relaxamento entre os dois grupos. Observamos que o grupo Hipertenso apresentou pD_2 significativamente menor ($p = 0,02$ e $U = 6$) para NA no subgrupo Após Isolamento (Figura 4.6.5.A). Após incubação com Veículo 24 h o grupo Hipertenso apresentou pD_2 maior que o grupo Controle ($p = 0,04$ e $U = 6$), sem diferença na $E_{\text{máx}}$ (Figura 4.6.5 B). Após tratamento com TMG, o grupo Hipertenso apresentou $E_{\text{máx}}$ significativamente menor ($p = 0,02$ e $U = 3$) que o grupo Controle (Figura 4.6.5 C), Tabela 4.6.3.

Figura 4.6.5 – Comparação da resposta vascular contrátil à noradrenalina entre os grupos Controle e Hipertenso. Curvas concentração-resposta à NA em artérias mesentéricas de pacientes dos grupos Controle e Hipertenso. (A), Curvas concentração-resposta à NA para os subgrupos Após Isolamento dos grupos Controle e Hipertenso; (B), Curvas concentração-resposta à NA para os subgrupos Veículo dos grupos Controle e Hipertenso; (C), Curvas concentração-resposta à NA para os subgrupos Thiamet G 100 µM dos grupos Controle e Hipertenso. Os valores experimentais de contração foram calculados em relação à resposta contrátil máxima por KCl (120 mM), considerada 100%. Os resultados são apresentados como média $\pm$ EPM de cada grupo experimental, # $p < 0,05$ vs. grupo Controle (A) e (B), * $p < 0,05$ vs. grupo Controle (C). A significância dos dados foi determinada por meio do teste de Mann-Whitney. * referente a diferença significativa em $E_{m\acute{a}x}$ e # referente a diferença significativa na pD_2 .

Os resultados da Figura 4.6.5 A demonstram que os anéis arteriais do grupo Hipertenso necessitam de uma concentração maior de NA que o grupo Controle para apresentar resposta contrátil semelhante e, após tratamento com TMG (Figura 4.6.5 C), essa diferença deixou de existir. Porém, o grupo Hipertenso não atingiu a mesma contração máxima que o grupo Controle (Figura 4.6.5 C), Tabela 4.6.3.

Comparamos então as respostas dos dois grupos quanto ao relaxamento mediado por NPS. Não observamos diferenças quanto ao relaxamento nos subgrupos Após Isolamento. Quando os anéis arteriais foram incubados com Veículo, notamos uma tendência à maior valor de $E_{m\acute{a}x}$ no grupo Hipertenso, mas sem significância estatística ($p = 0,0571$ e $U = 0$) (Figura 4.6.6 A e B). O grupo

Hipertenso apresentou menor pD_2 ($p = 0,006$ e $U = 0$) e menor $E_{m\acute{a}x}$ ($p = 0,006$ e $U = 0$) após tratamento com TMG, demonstrando a necessidade de maiores concentrações de NPS para o relaxamento arterial, sem atingir o efeito máximo observado no grupo Controle (Figura 4.6.6 C). Esses dados são compatíveis com o observado em animais experimentais em nosso laboratório (LIMA; GIACHINI; et al., 2009).

Figura 4.6.6 – Comparação da resposta vascular de relaxamento ao nitroprussiato de sódio entre os grupos Controle e Hipertenso. Curvas concentração-resposta ao nitroprussiato de sódio em artérias mesentéricas de pacientes dos grupos Controle e Hipertenso. (A), Curvas concentração-resposta ao NPS para os subgrupos Após Isolamento dos grupos Controle e Hipertenso; (B), Curvas concentração-resposta ao NPS para os subgrupos Veículo dos grupos Controle e Hipertenso; (C), Curvas concentração-resposta ao NPS para os subgrupos Thiamet G 100 µM dos grupos Controle e Hipertenso. Os valores experimentais de contração foram calculados em relação à resposta contrátil máxima por KCl (120 mM), considerada 100%. Os resultados são apresentados como média $\pm$ EPM de cada grupo experimental, # $p < 0,05$ vs. grupo Controle (C), * $p < 0,05$ vs. grupo Controle (C). A significância dos dados foi determinada por meio do teste de Mann-Whitney. * referente a diferença significativa em $E_{m\acute{a}x}$ e # referente a diferença significativa na pD_2 .

Tabela 4.6.3 – Valores de $E_{\text{máx}}$ e pD_2 para noradrenalina e nitroprussiato de sódio em segmentos de artéria mesentérica de pacientes dos grupos Controle e Hipertenso.

$E_{\text{máx}}$ (% KCl 120 mM)			
	Grupo Controle		Grupo Hipertenso
Noradrenalina		Noradrenalina	
Após Isolamento (N = 7)	119,8 ± 5,7	Após Isolamento (N = 6)	120,3 ± 7,9
Veículo (N = 8)	107,8 ± 7,4	Veículo (N = 5)	103,7 ± 2,2
Thiamet G 100 µM (N = 7)	132 ± 9,6	Thiamet G 100 µM (N = 5)	97,65 ± 4,2 ‡
Nitroprussiato de Sódio		Nitroprussiato de Sódio	
Após Isolamento (N = 4)	123,3 ± 11,5	Após Isolamento (N = 3)	114,1 ± 8,8
Veículo (N = 4)	85,59 ± 6,3	Veículo (N = 3)	143,9 ± 9,9
Thiamet G 100 µM (N = 7)	137,1 ± 8,4	Thiamet G 100 µM (N = 4)	92,1 ± 2,2
pD_2			
	Grupo Controle		Grupo Hipertenso
Noradrenalina		Noradrenalina	
Após Isolamento (N = 7)	6,1 ± 0,3	Após Isolamento (N = 6)	5,1 ± 0,3 ‡
Veículo (N = 8)	5,0 ± 0,2	Veículo (N = 5)	5,5 ± 0,1 ‡
Thiamet G 100 µM (N = 7)	5,5 ± 0,1	Thiamet G 100 µM (N = 5)	5,5 ± 0,1
Nitroprussiato de Sódio		Nitroprussiato de Sódio	
Após Isolamento (N = 4)	7,3 ± 0,4	Após Isolamento (N = 3)	7,8 ± 0,8
Veículo (N = 4)	6,6 ± 0,3	Veículo (N = 3)	13,8 ± 7,3
Thiamet G 100 µM (N = 7)	7,5 ± 0,1 ‡	Thiamet G 100 µM (N = 4)	5,6 ± 0,1 ‡

Resultados referentes às Figuras 4.6.5 e 4.6.6. Os dados são apresentados como média ± EPM de cada grupo. Os valores experimentais de contração e relaxamento foram calculados em relação à resposta contrátil produzida pelo KCl (120 mM), que foi considerada 100%. ‡ $p < 0,05$ vs. grupo Controle. A significância dos dados foi determinada por meio do teste de Mann-Whitney.

4.7 Diferenças entre os grupos populacionais estudados

A população estudada foi composta pelos pacientes em seguimento no serviço de Coloproctologia do Departamento de Cirurgia e Anatomia do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto. As amostras foram coletadas entre os anos de 2013 e 2016, no total de 50 pacientes, dos quais 32 estão no grupo Controle (20 homens e 12 mulheres) e 18 estão no grupo Hipertenso (7 homens e 11 mulheres). O grupo Hipertenso apresentou idade significativamente maior ($p = 0,002$; $t = 3,26$; $gl = 48$), assim como maior PAMi ($p = 0,02$; $t = 3,38$; $gl = 48$), Figura 4.7.1 A e B. e Tabela 4.7.1.

Figura 4.7.1 – Comparação da idade e da PAMi entre os grupos Controle e Hipertenso. Distribuição e média $\pm$ EPM das populações em estudo, sendo grupo Controle $n = 32$ e grupo Hipertenso, $n = 18$. (A), idade média dos grupos Controle e Hipertenso; (B), PAMi dos grupos Controle e Hipertenso. A significância dos dados foi determinada pelo teste t de Student (A – $p = 0,002$ $t = 3,26$ $gl = 48$; B – $p = 0,02$ $t = 3,38$ $gl = 48$).

Os grupos pouco se diferenciaram quanto a distribuição das doenças acometidas sendo as predominantes nos dois grupos os tumores de Reto, seguidos pelos de cólon Direito e cólon Transverso, correspondendo a aproximadamente 74% dos tumores do grupo Controle e 66% no grupo Hipertenso, Figura 4.7.2.

Figura 4.7.2 – Distribuição dos pacientes dos grupos Controle e Hipertenso de acordo com as patologias apresentadas. Distribuição percentual e em números absolutos das patologias que levaram os pacientes dos dois grupos à cirurgia.

Tabela 4.7.1 – Valores da média e erro padrão da média para Pressão Arterial Média na internação e Idade dos grupos Controle e Hipertenso.

	Grupo Controle	Grupo Hipertenso
Pressão Arterial Média na internação		
Média	88,5	93,9 ‡
EPM	± 1,4	± 1,9
N	32	18
Idade		
Média	53,2	65,1 ‡
EPM	± 2,1	± 3,0
N	32	18

Resultados referentes à figura 4.7.1. Os dados são apresentados como média ± EPM de cada grupo. ‡ $p < 0,05$ vs. grupo Controle. A significância dos dados foi determinada por meio do teste t de Student.

5 DISCUSSÃO

Vários mecanismos controlam os processos de contração e relaxamento das CMLVs. Entre estes mecanismos, as modificações pós-traducionais, como a O-GlcNAcilação, podem alterar respostas vasculares a estímulos contráteis (GIACHINI et al., 2008; LIMA et al., 2008; LIMA et al., 2010; LIMA et al., 2014). O aumento de proteínas modificadas por O-GlcNAc apresenta efeito ambíguo sobre as CMLVs, sendo protetor em situações de aumento agudo, mas lesivo quando o aumento ocorre de forma crônica (LIMA; RIGSBY; et al., 2009; LIMA et al., 2012; ZACHARA, 2012; ZACHARA et al., 2004).

O aumento crônico de O-GlcNAc está associado a aumento de respostas contráteis e redução do relaxamento vascular, assim como o aumento da produção de EROs (LIMA et al., 2010; LIMA; GIACHINI; et al., 2009; LIMA et al., 2012; SOUZA-SILVA et al., 2017). Essas alterações são constantemente descritas em doenças crônicas como diabetes e hipertensão arterial (BUTKINAREE et al., 2010; HART et al., 2011). Embora já tenha sido descrito que algumas proteínas que controlam a contratilidade vascular (LIMA et al., 2014) e a geração e inativação de EROs são modificadas por O-GlcNAc (MONTEZANO; TOUYZ, 2012; SOUZA-SILVA et al., 2017), pouco se sabe a respeito da VBH, responsável pela produção desse açúcar, e sua relação com o sistema vascular em humanos.

Considerando que: a VBH está presente em todas as células de mamíferos estudadas (ZACHARA et al., 2004); diversas células humanas expressam proteínas modificadas por O-GlcNAc (ZACHARA et al., 2004); o aumento de O-GlcNAc em CMLVs de animais altera a contratilidade e o relaxamento vascular (LIMA et al., 2008; LIMA; GIACHINI; et al., 2009); O-GlcNAc pode alterar a geração de EROs e influenciar as respostas vasculares (SOUZA-SILVA et al., 2017); decidimos investigar se a modificação de proteínas por O-GlcNAc modula a função vascular em humanos.

Inicialmente, nossos dados confirmam a presença dos principais componentes da VBH nas artérias mesentéricas humanas. Identificamos a presença de OGA com peso molecular aproximado de 130 kDa, enquanto a identificação da OGT evidenciou duas bandas com pesos moleculares de 115 e 103 kDa. Segundo a

literatura, a primeira banda corresponde à OGT citoplasmática, enquanto que a mais leve corresponde à OGT mitocondrial (mOGT) (Figura 4.1.1) (HANOVER et al., 2003).

Apesar do ensaio de western blot ter demonstrado que a técnica permite a identificação de GFAT – pela utilização de células HEK295T (células embrionárias renais humanas que expressam grande quantidade de GFAT) como controle positivo, não conseguimos identificar a presença de GFAT nas artérias mesentéricas de humanos, Figura Apêndice A. Como observado por Raman et al. há grande dificuldade de detecção da enzima GFAT pela técnica de western Blotting convencional em CMLVs humanas, sendo necessárias técnicas não abordadas nesse trabalho como a quantificação de RNA mensageiro ou a indução de aumento da expressão por transinfecção de DNA (RAMAN et al., 2007).

Confirmamos também que TMG é capaz de inibir OGA ao avaliarmos a sua atividade enzimática após tratamento com este inibidor (GROVES et al., 2013). Efeito semelhante, porém mais discreto e sem significância estatística, foi observado ao estimularmos os anéis arteriais com PUGNAc (Figura 4.1.2). Com a efetividade do TMG comprovada, avaliamos os efeitos da incubação com este inibidor por 24 h sobre os componentes da VBH em artérias de pacientes do grupo Controle. Após o tratamento, notamos que a inibição da OGA aumentou a quantidade de proteínas modificadas por O-GlcNAc, como observado em modelo animal em nosso laboratório (LIMA et al., 2008). Houve aumento da expressão dessa enzima, mecanismo compensatório esperado, e não houve nenhuma alteração na expressão de OGT, resultado oposto ao observado em modelos animais onde observamos uma redução da expressão de OGT compensatória ao aumento dos níveis de proteínas modificadas por O-GlcNAc (LIMA et al., 2008; LIMA; GIACHINI; et al., 2009).

Realizamos os experimentos desse trabalho inicialmente com duas concentrações diferentes de TMG, 100 μ M e 1 μ M. Porém, utilizando a concentração de 1 μ M nos experimentos iniciais, não observamos resposta quanto ao aumento dos níveis de proteínas modificadas por O-GlcNAc, assim como não detectamos inibição da atividade de OGA (Figura Apêndice C, gráficos A e B respectivamente). Realizamos testes de reatividade vascular e obtivemos respostas semelhantes às obtidas com Veículo, como observado na Figura Apêndice C, gráficos C e D. Frente

a esses resultados e a dificuldade de obtermos amostras para o trabalho, optamos por utilizar apenas a concentração de TMG 100 μ M.

A seguir avaliamos as alterações nas respostas de contração à NA e de relaxamento ao NPS. Optamos pelo uso de NA como agente vasoconstrictor por apresentar uma melhor resposta quando comparado à fenilefrina, vasoconstrictor de escolha para animais em nosso laboratório. O fato de termos observado melhor resposta à NA é corroborado por Hutri-Kähönen et al., cujo trabalho descreveu maior sensibilidade dos vasos mesentéricos humanos à NA quando comparado à resposta de vasos mesentéricos de ratos (HUTRI-KAHONEN; KAHONEN; JOLMA; et al., 1999).

Como agente vasodilatador, optamos pelo NPS, uma vez que não obtivemos respostas de relaxamento consistentes com a acetilcolina (Ach) 10 μ M. A falta de resposta à Ach pode ser explicada por diversos fatores: 1) as cirurgias são realizadas por médicos residentes do HCFMRP-USP, o que leva ao aumento do tempo de cirurgia e manipulação da peça cirúrgica, fatores que poderiam causar maior lesão vascular e endotelial; 2) o procedimento envolve prolongado tempo de isquemia fria, 8 h, até a dissecação dos anéis arteriais, fator que também aumenta a lesão endotelial (HALL et al., 2006); 3) pacientes hipertensos apresentam resposta deficiente à Ach (COLAS et al., 2001; MATOBA et al., 2002); 4) humanos apresentam resposta irregular à Ach (COLAS et al., 2001), comparativamente menor àquela observada em ratos (HUTRI-KAHONEN; KAHONEN; JOLMA; et al., 1999); 5) o aumento da idade está relacionado à redução da vasodilatação mediada por fatores endoteliais (HUTRI-KAHONEN; KAHONEN; JOLMA; et al., 1999).

Para a realização dos experimentos de reatividade vascular, primeiramente confirmamos que a incubação com o veículo diluente, DMSO, preservava a função contrátil dos anéis arteriais (Figura 4.6.1 A). No subgrupo Após Isolamento, as artérias foram submetidas ao estresse da manipulação cirúrgica, isquemia fria e dissecação dos anéis arteriais. A ausência desses fatores estressantes e a incubação com Veículo à 37°C por 24 h poderiam justificar a redução da pD_2 para NA (Figura 4.6.1 A).

Como descrito acima, o tratamento com TMG induziu o aumento dos níveis de proteínas modificadas por O-GlcNAc mediante a inibição de OGA, assim como aumentou os valores de pD_2 e $E_{máx}$ para NA, porém sem diferença significativa.

Resultados muito parecidos com os obtidos previamente em nosso laboratório em modelo animal (LIMA et al., 2008).

O próximo passo foi avaliar a função de relaxamento das artérias dos pacientes do grupo Controle. Após incubação com Veículo, observamos redução da $E_{\text{máx}}$ para NPS (Figura 4.6.2 A) e após tratamento com TMG houve aumento da $E_{\text{máx}}$ e da pD_2 para NPS (figura 4.6.2 B). Esses dados são contrastantes com os observados em animais em nosso laboratório (LIMA; GIACHINI; et al., 2009). Lima et al. descreveram redução do relaxamento vascular quando artérias apresentam aumento dos níveis de proteínas modificadas por O-GlcNAc mediado por tratamento com PUGNAc. Os dados acima nos sugerem que, em pacientes do grupo Controle, a condição de estresse vascular e aumento dos níveis de proteínas modificadas por O-GlcNAc predispõem os vasos arteriais a uma melhor resposta a agentes vasoconstrictores (NA) e vasodilatadores (NPS).

Prosseguimos então à análise da geração de EROs. No grupo Controle, observamos redução não significativa na geração de EROs após tratamento com TMG por 24 h. Esse dado nos sugere que o aumento dos níveis de proteínas modificadas por O-GlcNAc mediado pelo tratamento com TMG por 24 h possa proteger a célula do estresse oxidativo ao reduzir a geração de EROs, dados também opostos aos observados em modelos animais (LIMA et al., 2012; SOUZA-SILVA et al., 2017). Nesses experimentos não apresentamos os resultados do grupo Veículo pois, como observado na Figura Apêndice B, não houve diferença significativa entre os subgrupos Após Isolamento e Veículo, tanto no grupo Controle, como no grupo Hipertenso. Frente a esses resultados, optamos por apresentar apenas os valores basais do subgrupo Após Isolamento para comparação com o tratamento com TMG.

Os mesmos experimentos descritos acima foram realizados também com PUGNAc, inibidor menos seletivo da enzima OGA. Em artérias mesentéricas do grupo Controle, PUGNAc não foi capaz de aumentar os níveis de proteínas modificadas por O-GlcNAc (Figura 4.2.1 A), assim como reduziu de forma discreta e não significativa a atividade enzimática dessa proteína (Figura 4.1.2). Apesar de não se refletir na atividade enzimática, PUGNAc foi capaz de inibir parcialmente OGA, a ponto de desencadear aumento significativo da expressão dessa proteína (Figura 4.2.1 B). Ao realizarmos os experimentos de reatividade vascular não observamos

nenhuma alteração, pelo PUGNAc, nas respostas de contratilidade ou relaxamento vascular mediadas por NA e NPS, respectivamente, em concordância com os resultados obtidos na etapa de caracterização dos efeitos bioquímicos do PUGNAc.

As respostas do grupo Hipertenso ao tratamento com TMG e PUGNAc apresentam comportamento diferente ao observado no grupo Controle. O tratamento com TMG e PUGNAc não produziu aumento das proteínas modificadas por O-GlcNAc, (Figura 4.3.1). Não observamos diferença na expressão de OGT (Figura 4.3.3), assim como no grupo Controle (Figura 4.2.3). Houve aumento significativo na expressão de OGA em presença de TMG (Figura 4.3.2), resposta semelhante à do grupo Controle. O tratamento com PUGNAc não alterou a expressão de OGA no grupo hipertenso, oposto do observado no grupo Controle. Observamos que a atividade enzimática de OGA não sofreu alterações no grupo Hipertenso (Figura 4.3.4), em oposição ao ocorrido com o grupo Controle.

Ao observarmos a reatividade vascular, o grupo Hipertenso também apresentou resposta diferente da descrita no grupo Controle. As artérias do grupo Hipertenso não apresentaram alteração de sua função contrátil após 24 h em meio com Veículo ou TMG (Figura 4.6.3 B). Mesmo comportamento foi observado ao avaliar o relaxamento arterial mediado por NPS, TMG induziu discreta redução da pD_2 e da $E_{máx}$, sem significância estatística. Esses dados corroboram os observados em animais em nosso laboratório (LIMA; GIACHINI; et al., 2009).

Ao compararmos as respostas dos grupos Controle e Hipertenso identificamos diferentes respostas aos tratamentos constritores e dilatadores. No subgrupo Após Isolamento, o grupo Hipertenso apresentou uma menor sensibilidade à NA, sem alteração da contração máxima (Figura 4.6.5 A), mas não apresentou nenhuma alteração no relaxamento mediado por NPS (Figura 4.6.6 A). Após 24 h em meio com Veículo, ambos os grupos apresentaram respostas semelhantes à NA, com o grupo Hipertenso significativamente mais sensível à NA que o grupo Controle (Figura 4.6.5 B). Em relação ao NPS, apesar da discreta diferença entre as curvas, não houve diferença estatística significativa entre os dados (Figura 4.6.6 B). Hutri-Kähönen et al. relataram resultados semelhantes. No entanto, não identificaram diferença na sensibilidade à NA no grupo hipertenso, como observado em nossos dados (HUTRI-KAHONEN; KAHONEN; WU; et al., 1999).

Após tratamento com TMG por 24 h, o grupo Hipertenso apresentou contração máxima à NA significativamente menor que o grupo Controle (Figura 4.6.5 C), resposta contrária à observada em animais experimentais em nosso laboratório (LIMA et al., 2008; LIMA et al., 2010). Em relação à resposta de relaxamento ao NPS, o grupo Hipertenso apresentou menor pD_2 e $E_{máx}$ ao NPS (Figura 4.6.6 C). A atividade enzimática de OGA no grupo Hipertenso representa um dado importante. Na Figura 4.4.4 B, observamos uma discreta redução da atividade de OGA no grupo Hipertenso, subgrupo Após Isolamento, sem diferença estatística em relação ao grupo Controle. Esse dado nos sugere que a atividade da OGA, embora mantida no grupo Hipertenso, está constitutivamente reduzida, o que justificaria a ausência de efeito do TMG, assim como os níveis de proteínas modificadas por O-GlcNAc e os efeitos sobre a reatividade vascular descritos acima.

Outro dado muito importante que difere entre animais experimentais e os humanos participantes desse estudo é o uso adequado da medicação anti-hipertensiva pelo grupo Hipertenso. Apesar de existir diferença entre a PAMi dos dois grupos (Figura 4.7.1 B), todos os pacientes participantes do grupo Hipertenso apresentavam controle da pressão arterial dentro dos limites considerados adequados (MALACHIAS, M. et al., 2016). A média de idade do grupo Hipertenso é maior que a do Controle, Figura 4.7.1 A, dado já considerado um fator independente relacionado ao aumento dos níveis pressóricos (MALACHIAS, M. et al., 2016). Os dados nos sugerem que artérias mesentéricas de humanos respondem ao tratamento com TMG de forma distinta de artérias mesentéricas de animais experimentais, tanto em situação controle como em presença de HAS.

Descrevemos em nosso laboratório que o aumento de O-GlcNAc por 24 h induz alterações arteriais funcionais semelhantes àsquelas observadas na hipertensão arterial crônica em modelos animais (LIMA et al., 2008; LIMA et al., 2010; LIMA; GIACHINI; CARNEIRO; et al., 2011; LIMA; GIACHINI; HARDY; et al., 2011). Porém, não observamos alteração na expressão de OGT em nossas amostras (Figura 4.2.1 C) como as observadas em modelos animais. Obtivemos efeitos associados a aumento de sobrevivência celular, como observado na Figura 4.5.1, ou seja, após o tratamento com TMG o grupo Controle apresentou tendência à redução da geração de EROs, como descrito por Zachara et al (ZACHARA, 2012; ZACHARA et al., 2004). Os dados também podem ser interpretados em função do

tempo de exposição às drogas. Neste sentido, é possível que o tratamento por 24 h com TMG não seja longo o suficiente para observarmos alterações crônicas como as observadas nos animais experimentais, mas apenas respostas agudas que favorecem a proteção celular.

O aumento da sobrevivência celular mediada pelos altos níveis de proteínas modificadas por O-GlcNAc poderia justificar a redução da resposta à NA observada no grupo Controle incubado com veículo na Figura 4.6.1 A. O tratamento com TMG reduziria o número de apoptoses nos anéis arteriais preservando a função vascular após 24 h de incubação. No entanto, observamos na Figura Apêndice D que a incubação com veículo por 24 h não altera a geração de EROs no grupo Controle, dado que se opõe à hipótese de aumento da apoptose nesse grupo.

As respostas observadas no grupo Hipertenso são interessantes, pois as artérias desse grupo se mostram muito estáveis, sofrendo poucas influências da manipulação e do estresse relacionados à coleta e ao preparo dos experimentos, assim como ao tratamento com TMG por 24 h. Essas características são muito importantes para a manutenção de níveis pressóricos adequados durante as atividades diárias protegendo os pacientes contra picos hipertensivos, responsáveis pelas principais complicações relacionadas à hipertensão arterial como infarto do miocárdio, acidente vascular encefálico e edema agudo pulmonar (MALACHIAS, MVVB et al., 2016; MALACHIAS, M. V. B. et al., 2016).

O efeito sobre a função arterial no grupo Controle resultante do aumento dos níveis de proteínas modificadas por O-GlcNAc pode ser considerado favorável em situações de estresse agudo, uma vez que: 1) uma melhor resposta arterial a drogas contráteis como a NA é necessária em eventos como choque hemorrágico, trauma e septicemia; 2) melhor resposta a drogas que induzem relaxamento como NPS em eventos de picos hipertensivos como edema cerebral secundário a trauma encefálico.

Experimentos direcionados a avaliar a apoptose celular, assim como períodos mais longos de tratamento com TMG são necessários para diferenciarmos os efeitos agudos de proteção celular dos efeitos crônicos vasculares observados em modelos animais. A divisão dos pacientes hipertensos em subgrupos de acordo com as medicações anti-hipertensivas será necessária para avaliarmos a influência de cada

grupo de droga sobre níveis de proteínas modificadas por O-GlcNAc e seus efeitos sobre contratilidade e relaxamento vasculares.

6 CONCLUSÃO

Nossos resultados nos levam a concluir que o aumento de proteínas modificadas por O-GlcNAc, mediado por TMG, em CMLVs alterou a função contrátil das artérias mesentéricas de humanos, aumentando a resposta a NA e aumentando a vasodilatação por NPS no grupo Controle. Alterações discretas foram observadas no grupo Hipertenso, resultados diferentes dos observados em modelo animal em nosso laboratório. O aumento de proteínas modificadas por O-GlcNAc não induziu aumento de EROs, sugerindo um efeito protetor relacionado ao aumento agudo dos níveis intracelulares de proteínas modificadas por O-GlcNAc.

Nossos resultados demonstram que a VBH está presente nas CMLVs e que os níveis de proteínas modificadas por O-GlcNAc influenciam a resposta vascular frente a drogas vasoconstrictoras e vasodilatadores. Essas informações são bastante úteis clinicamente, pois nos ajudam a entender como a função dos vasos está alterada, ou como podemos alterá-la para nos beneficiar dos seus efeitos, principalmente nos cuidados com pacientes críticos.

A pesquisa com humanos impõe uma série de dificuldades que não estão presentes nas pesquisas com animais experimentais: 1) maiores prazos para aprovação do projeto e do termo de consentimento livre e esclarecido; 2) limitações quanto a coleta de amostras e experimentos que podem ser realizados; 3) número de participantes variável durante o projeto; 4) grande variabilidade entre os grupos de participantes estudados; são apenas algumas das dificuldades presentes nesses trabalhos. Apesar dessas dificuldades, esse trabalho apresentou contribuições importantes a respeito da função contrátil das artérias mesentéricas, e possibilidades de influenciar diretamente a resposta desses vasos a drogas vasoativas. Projetos como esse trazem grande retorno à sociedade pela capacidade de produzir conhecimento que impactará diretamente na vida e na saúde da população.

REFERÊNCIAS¹

- AUCH-SCHWELK, W.; KATUSIC, Z. S.; VANHOUTTE, P. M. Contractions to oxygen-derived free radicals are augmented in aorta of the spontaneously hypertensive rat. **Hypertension**, v. 13, n. 6 Pt 2, p. 859-64, Jun 1989.
- BOND, M. R.; HANOVER, J. A. A little sugar goes a long way: the cell biology of O-GlcNAc. **J Cell Biol**, v. 208, n. 7, p. 869-80, Mar 30 2015.
- BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**, v. 414, n. 6865, p. 813-20, Dec 13 2001.
- 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, n. 2, p. 96-106, Feb 2010.
- CHAMPATTANACHAI, V.; MARCHASE, R. B.; CHATHAM, J. C. Glucosamine protects neonatal cardiomyocytes from ischemia-reperfusion injury via increased protein-associated O-GlcNAc. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 292, n. 1, p. C178-87, Jan 2007.
- CHAMPATTANACHAI, V.; MARCHASE, R. B.; CHATHAM, J. C. Glucosamine protects neonatal cardiomyocytes from ischemia-reperfusion injury via increased protein O-GlcNAc and increased mitochondrial Bcl-2. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 294, n. 6, p. C1509-20, Jun 2008.
- CHATHAM, J. C. et al. Hexosamine biosynthesis and protein O-glycosylation: the first line of defense against stress, ischemia, and trauma. **Shock**, v. 29, n. 4, p. 431-40, Apr 2008.
- CHIGNALIA, A. Z. et al. Testosterone induces vascular smooth muscle cell migration by NADPH oxidase and c-Src-dependent pathways. **Hypertension**, v. 59, n. 6, p. 1263-71, Jun 2012.
- COLAS, B. et al. Direct vascular actions of methyclothiazide in remodeled mesenteric arteries from hypertensive patients. **Am J Hypertens**, v. 14, n. 10, p. 989-94, Oct 2001.
- DASSANAYAKA, S.; JONES, S. P. O-GlcNAc and the cardiovascular system. **Pharmacol Ther**, v. 142, n. 1, p. 62-71, Apr 2014.
- DAVIDOFF, A. J. Convergence of glucose- and fatty acid-induced abnormal myocardial excitation-contraction coupling and insulin signalling. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 33, n. 1-2, p. 152-8, Jan-Feb 2006.

¹ Sistema autor-data de acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).

DAVIDOFF, A. J.; REN, J. Low insulin and high glucose induce abnormal relaxation in cultured adult rat ventricular myocytes. **Am J Physiol**, v. 272, n. 1 Pt 2, p. H159-67, Jan 1997.

DUTTA, K. et al. Depressed PKA activity contributes to impaired SERCA function and is linked to the pathogenesis of glucose-induced cardiomyopathy. **J Mol Cell Cardiol**, v. 34, n. 8, p. 985-96, Aug 2002.

FLINDER, L. I. et al. EGF-induced ERK-activation downstream of FAK requires rac1-NADPH oxidase. **J Cell Physiol**, v. 226, n. 9, p. 2267-78, Sep 2011.

FULOP, N. et al. 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, n. 5, p. H2227-36, May 2007.

GAO, Y. et al. Dynamic O-glycosylation of nuclear and cytosolic proteins: cloning and characterization of a neutral, cytosolic beta-N-acetylglucosaminidase from human brain. **J Biol Chem**, v. 276, n. 13, p. 9838-45, Mar 30 2001.

GIACCO, F.; BROWNLEE, M. Oxidative stress and diabetic complications. **Circ Res**, v. 107, n. 9, p. 1058-70, Oct 29 2010.

GIACHINI, F. R. et al. Pyk2 mediates increased adrenergic contractile responses in arteries from DOCA-salt mice - VASOACTIVE PEPTIDE SYMPOSIUM. **J Am Soc Hypertens**, v. 2, n. 6, p. 431-8, Nov-Dec 2008.

GIACHINI, F. R. et al. Extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation, via downregulation of mitogen-activated protein kinase phosphatase 1, mediates sex differences in desoxycorticosterone acetate-salt hypertension vascular reactivity. **Hypertension**, v. 55, n. 1, p. 172-9, Jan 2010.

GIACHINI, F. R. et al. Interleukin-10 attenuates vascular responses to endothelin-1 via effects on ERK1/2-dependent pathway. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 296, n. 2, p. H489-96, Feb 2009.

GRECH, E. D. et al. Evidence for free radical generation after primary percutaneous transluminal coronary angioplasty recanalization in acute myocardial infarction. **Am J Cardiol**, v. 77, n. 2, p. 122-7, Jan 15 1996.

GRIFFITHS, E. J. et al. Mitochondrial calcium transporting pathways during hypoxia and reoxygenation in single rat cardiomyocytes. **Cardiovasc Res**, v. 39, n. 2, p. 423-33, Aug 1998.

GROVES, J. A. et al. Dynamic O-GlcNAcylation and its roles in the cellular stress response and homeostasis. **Cell Stress Chaperones**, v. 18, n. 5, p. 535-58, Sep 2013.

GROVES, J. A. et al. Fatty acid synthase inhibits the O-GlcNAcase during oxidative stress. **J Biol Chem**, v. 292, n. 16, p. 6493-6511, Apr 21 2017.

HALL, J. et al. Mechanisms of agonist-induced constriction in isolated human mesenteric arteries. **Vascul Pharmacol**, v. 44, n. 6, p. 427-33, Jun 2006.

HANOVER, J. A. et al. O-linked N-acetylglucosamine is attached to proteins of the nuclear pore. Evidence for cytoplasmic and nucleoplasmic glycoproteins. **J Biol Chem**, v. 262, n. 20, p. 9887-94, Jul 15 1987.

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, n. 2, p. 80-95, Feb 2010.

HANOVER, J. A. et al. Mitochondrial and nucleocytoplasmic isoforms of O-linked GlcNAc transferase encoded by a single mammalian gene. **Arch Biochem Biophys**, v. 409, n. 2, p. 287-97, Jan 15 2003.

HART, G. W. Dynamic O-linked glycosylation of nuclear and cytoskeletal proteins. **Annu Rev Biochem**, v. 66, p. 315-35, 1997.

HART, G. W. et al. Glycosylation in the nucleus and cytoplasm. **Annu Rev Biochem**, v. 58, p. 841-74, 1989.

HART, G. W.; HOUSLEY, M. P.; SLAWSON, C. Cycling of O-linked beta-N-acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins. **Nature**, v. 446, n. 7139, p. 1017-22, Apr 26 2007.

HART, G. W. et al. Cross talk between O-GlcNAcylation and phosphorylation: roles in signaling, transcription, and chronic disease. **Annu Rev Biochem**, v. 80, p. 825-58, 2011.

HARTWECK, L. M. et al. SECRET AGENT and SPINDLY have overlapping roles in the development of *Arabidopsis thaliana* L. Heyn. **J Exp Bot**, v. 57, n. 4, p. 865-75, 2006.

HATA, Y. et al. Transcription factors Sp1 and Sp3 alter vascular endothelial growth factor receptor expression through a novel recognition sequence. **J Biol Chem**, v. 273, n. 30, p. 19294-303, Jul 24 1998.

HEDOU, J. et al. O-linked N-acetylglucosaminylation is involved in the Ca²⁺ activation properties of rat skeletal muscle. **J Biol Chem**, v. 282, n. 14, p. 10360-9, Apr 06 2007.

HILGERS, R. H.; TODD, J., JR.; WEBB, R. C. Regional heterogeneity in acetylcholine-induced relaxation in rat vascular bed: role of calcium-activated K⁺ channels. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 291, n. 1, p. H216-22, Jul 2006.

HOLT, G. D. et al. Erythrocytes contain cytoplasmic glycoproteins. O-linked GlcNAc on Band 4.1. **J Biol Chem**, v. 262, n. 31, p. 14847-50, Nov 05 1987.

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, n. 17, p. 8049-57, Jun 15 1986.

HU, P.; SHIMOJI, S.; HART, G. W. Site-specific interplay between O-GlcNAcylation and phosphorylation in cellular regulation. **FEBS Lett**, v. 584, n. 12, p. 2526-38, Jun 18 2010.

HUTRI-KAHONEN, N. et al. Control of mesenteric arterial tone in vitro in humans and rats. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 359, n. 4, p. 322-30, Apr 1999.

HUTRI-KAHONEN, N. et al. Control of vascular tone in isolated mesenteric arterial segments from hypertensive patients. **Br J Pharmacol**, v. 127, n. 7, p. 1735-43, Aug 1999.

JONES, S. P. et al. Cardioprotection by N-acetylglucosamine linkage to cellular proteins. **Circulation**, v. 117, n. 9, p. 1172-82, Mar 04 2008.

JU, Y. et al. Modulation of TNF-alpha-induced endothelial cell activation by glucosamine, a naturally occurring amino monosaccharide. **Int J Mol Med**, v. 22, n. 6, p. 809-15, Dec 2008.

KANETO, H. et al. Activation of the hexosamine pathway leads to deterioration of pancreatic beta-cell function through the induction of oxidative stress. **J Biol Chem**, v. 276, n. 33, p. 31099-104, Aug 17 2001.

KEYSE, S. M. The role of protein phosphatases in the regulation of mitogen and stress-activated protein kinases. **Free Radic Res**, v. 31, n. 4, p. 341-9, Oct 1999.

KIM, D. I. et al. Probing nuclear pore complex architecture with proximity-dependent biotinylation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 111, n. 24, p. E2453-61, Jun 17 2014.

KIM, E. J. et al. Distinctive inhibition of O-GlcNAcase isoforms by an alpha-GlcNAc thiolsulfonate. **J Am Chem Soc**, v. 129, n. 48, p. 14854-5, Dec 5 2007.

KIM, J. et al. Phospholipase D is involved in oxidative stress-induced migration of vascular smooth muscle cells via tyrosine phosphorylation and protein kinase C. **Exp Mol Med**, v. 36, n. 2, p. 103-9, Apr 30 2004.

KONISHI, H. et al. Activation of protein kinase C by tyrosine phosphorylation in response to H₂O₂. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 21, p. 11233-7, Oct 14 1997.

KREPPEL, L. K.; BLOMBERG, M. A.; HART, G. W. Dynamic glycosylation of nuclear and cytosolic proteins. Cloning and characterization of a unique O-GlcNAc transferase with multiple tetratricopeptide repeats. **J Biol Chem**, v. 272, n. 14, p. 9308-15, Apr 4 1997.

LACOMBE, V. A. et al. Mechanisms of impaired calcium handling underlying subclinical diastolic dysfunction in diabetes. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 293, n. 5, p. R1787-97, Nov 2007.

LACZY, B. et al. Protein O-GlcNAcylation: a new signaling paradigm for the cardiovascular system. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 296, n. 1, p. H13-28, Jan 2009.

LACZY, B. et al. Inhibition of O-GlcNAcase in perfused rat hearts by NAG-thiazolines at the time of reperfusion is cardioprotective in an O-GlcNAc-dependent manner. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 299, n. 5, p. H1715-27, Nov 2010.

LANDMESSER, U.; HARRISON, D. G. Oxidative stress and vascular damage in hypertension. **Coron Artery Dis**, v. 12, n. 6, p. 455-61, Sep 2001.

LEE, A. et al. Combined Antibody/Lectin Enrichment Identifies Extensive Changes in the O-GlcNAc Sub-proteome upon Oxidative Stress. **J Proteome Res**, v. 15, n. 12, p. 4318-4336, Dec 02 2016.

LIMA, V. V. et al. Increased vascular O-GlcNAcylation augments reactivity to constrictor stimuli - VASOACTIVE PEPTIDE SYMPOSIUM. **J Am Soc Hypertens**, v. 2, n. 6, p. 410-7, Nov-Dec 2008.

LIMA, V. V. et al. O-GlcNAcylation contributes to augmented vascular reactivity induced by endothelin 1. **Hypertension**, v. 55, n. 1, p. 180-8, Jan 2010.

LIMA, V. V. et al. O-GlcNAcylation contributes to the vascular effects of ET-1 via activation of the RhoA/Rho-kinase pathway. **Cardiovasc Res**, v. 89, n. 3, p. 614-22, Feb 15 2011.

LIMA, V. V. et al. Impaired vasodilator activity in deoxycorticosterone acetate-salt hypertension is associated with increased protein O-GlcNAcylation. **Hypertension**, v. 53, n. 2, p. 166-74, Feb 2009.

LIMA, V. V. et al. O-GlcNAcylation: a novel pathway contributing to the effects of endothelin in the vasculature. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 300, n. 2, p. R236-50, Feb 2011.

LIMA, V. V. et al. Vascular O-GlcNAcylation augments reactivity to constrictor stimuli by prolonging phosphorylated levels of the myosin light chain. **Braz J Med Biol Res**, v. 0, p. 0, Aug 15 2014.

LIMA, V. V. et al. O-GlcNAcylation: a novel post-translational mechanism to alter vascular cellular signaling in health and disease: focus on hypertension. **J Am Soc Hypertens**, v. 3, n. 6, p. 374-87, Nov-Dec 2009.

LIMA, V. V. et al. O-GlcNAcylation and oxidation of proteins: is signalling in the cardiovascular system becoming sweeter? **Clin Sci (Lond)**, v. 123, n. 8, p. 473-86, Oct 2012.

LIU, J.; MARCHASE, R. B.; CHATHAM, J. C. Increased O-GlcNAc levels during reperfusion lead to improved functional recovery and reduced calpain proteolysis. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 293, n. 3, p. H1391-9, Sep 2007.

LIU, J. et al. Increased hexosamine biosynthesis and protein O-GlcNAc levels associated with myocardial protection against calcium paradox and ischemia. **J Mol Cell Cardiol**, v. 40, n. 2, p. 303-12, Feb 2006.

LOVE, D. C. et al. Mitochondrial and nucleocytoplasmic targeting of O-linked GlcNAc transferase. **J Cell Sci**, v. 116, n. Pt 4, p. 647-54, Feb 15 2003.

LUBAS, W. A. et al. O-Linked GlcNAc transferase is a conserved nucleocytoplasmic protein containing tetratricopeptide repeats. **J Biol Chem**, v. 272, n. 14, p. 9316-24, Apr 04 1997.

LUBAS, W. A.; HANOVER, J. A. Functional expression of O-linked GlcNAc transferase. Domain structure and substrate specificity. **J Biol Chem**, v. 275, n. 15, p. 10983-8, Apr 14 2000.

LUO, B. et al. Chronic hexosamine flux stimulates fatty acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase in adipocytes. **J Biol Chem**, v. 282, n. 10, p. 7172-80, Mar 09 2007.

MALACHIAS, M. et al. 7th Brazilian Guideline of Arterial Hypertension: Chapter 8 - Hypertension and Associated Clinical Conditions. **Arq Bras Cardiol**, v. 107, n. 3 Suppl 3, p. 44-48, Sep 2016.

MALACHIAS, M. et al. 7th Brazilian Guideline of Arterial Hypertension: Chapter 1 - Concept, Epidemiology and Primary Prevention. **Arq Bras Cardiol**, v. 107, n. 3 Suppl 3, p. 1-6, Sep 2016.

MALACHIAS, M. V. B. et al. 7th Brazilian Guideline of Arterial Hypertension: Chapter 14 - Hypertensive Crisis. **Arq Bras Cardiol**, v. 107, n. 3 Suppl 3, p. 79-83, Sep 2016.

MATOBA, T. et al. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in human mesenteric arteries. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 290, n. 3, p. 909-13, Jan 25 2002.

MILLER, A. P. et al. Estrogen modulates inflammatory mediator expression and neutrophil chemotaxis in injured arteries. **Circulation**, v. 110, n. 12, p. 1664-9, Sep 21 2004.

MILLER, A. P. et al. Aged rats lose vasoprotective and anti-inflammatory actions of estrogen in injured arteries. **Menopause**, v. 14, n. 2, p. 251-60, Mar-Apr 2007.

MONTEZANO, A. C.; TOUYZ, R. M. Molecular mechanisms of hypertension--reactive oxygen species and antioxidants: a basic science update for the clinician. **Can J Cardiol**, v. 28, n. 3, p. 288-95, May 2012.

MORETTO, L. D. M., R. **Manual das Denominações Comuns Brasileiras**: São Paulo: SINDUSFARMA. 16: 704 p. 2013. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeiabrasileira/conteudo/2013/Manual%20DCB%202013%20Versão%20final.pdf>. Acesso em: 23 jan. 2018.

MURATA, M. et al. Mitochondrial ATP-sensitive potassium channels attenuate matrix Ca^{2+} overload during simulated ischemia and reperfusion: possible mechanism of cardioprotection. **Circ Res**, v. 89, n. 10, p. 891-8, Nov 09 2001.

NGOH, G. A. et al. Unique hexosaminidase reduces metabolic survival signal and sensitizes cardiac myocytes to hypoxia/reoxygenation injury. **Circ Res**, v. 104, n. 1, p. 41-9, Jan 2 2009.

NGOH, G. A. et al. O-GlcNAc signaling in the cardiovascular system. **Circ Res**, v. 107, n. 2, p. 171-85, Jul 23 2010.

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, n. 3, p. 602-9, Dec 2008.

NGOH, G. A. et al. Non-canonical glycosyltransferase modulates post-hypoxic cardiac myocyte death and mitochondrial permeability transition. **J Mol Cell Cardiol**, v. 45, n. 2, p. 313-25, Aug 2008.

NGOH, G. A. et al. Augmented O-GlcNAc signaling attenuates oxidative stress and calcium overload in cardiomyocytes. **Amino Acids**, v. 40, n. 3, p. 895-911, Mar 2011.

NOLTE, D.; MULLER, U. Human O-GlcNAc transferase (OGT): genomic structure, analysis of splice variants, fine mapping in Xq13.1. **Mamm Genome**, v. 13, n. 1, p. 62-4, Jan 2002.

PATTI, M. E. et al. Activation of the hexosamine pathway by glucosamine in vivo induces insulin resistance of early postreceptor insulin signaling events in skeletal muscle. **Diabetes**, v. 48, n. 8, p. 1562-71, Aug 1999.

RAJAPAKSE, A. G. et al. The hexosamine biosynthesis inhibitor azaserine prevents endothelial inflammation and dysfunction under hyperglycemic condition through antioxidant effects. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 296, n. 3, p. H815-22, Mar 2009.

RAMAN, P. et al. Glycosylation mediates up-regulation of a potent antiangiogenic and proatherogenic protein, thrombospondin-1, by glucose in vascular smooth muscle cells. **J Biol Chem**, v. 282, n. 8, p. 5704-14, Feb 23 2007.

REN, J. et al. High extracellular glucose impairs cardiac E-C coupling in a glycosylation-dependent manner. **Am J Physiol**, v. 273, n. 6 Pt 2, p. H2876-83, Dec 1997.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, M. A. et al. Contractile responses elicited by hydrogen peroxide in aorta from normotensive and hypertensive rats. Endothelial modulation and mechanism involved. **Br J Pharmacol**, v. 125, n. 6, p. 1329-35, Nov 1998.

SAFAR, M. E.; BOUDIER, H. S. Vascular development, pulse pressure, and the mechanisms of hypertension. **Hypertension**, v. 46, n. 1, p. 205-9, Jul 2005.

SHAFI, R. et al. The O-GlcNAc transferase gene resides on the X chromosome and is essential for embryonic stem cell viability and mouse ontogeny. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 11, p. 5735-9, May 23 2000.

SINGH, L. P. et al. Hexosamine induction of oxidative stress, hypertrophy and laminin expression in renal mesangial cells: effect of the anti-oxidant alpha-lipoic acid. **Cell Biochem Funct**, v. 25, n. 5, p. 537-50, Sep-Oct 2007.

SOUZA-SILVA, L. et al. Glycosylation with O-Linked beta-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) induces vascular dysfunction via production of superoxide anion / reactive oxygen species. **Can J Physiol Pharmacol**, Aug 09 2017.

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

SZABO, C. Multiple pathways of peroxynitrite cytotoxicity. **Toxicol Lett**, v. 140-141, p. 105-12, Apr 11 2003.

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, n. 5, p. 3308-17, Mar 10 1984.

TOUYZ, R. M.; BRIONES, A. M. Reactive oxygen species and vascular biology: implications in human hypertension. **Hypertens Res**, v. 34, n. 1, p. 5-14, Jan 2011.

TOUYZ, R. M.; SCHIFFRIN, E. L. Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. **Histochem Cell Biol**, v. 122, n. 4, p. 339-52, Oct 2004.

VARKI, A.; SHARON, N. Historical Background and Overview. In: VARKI, A.; CUMMINGS, R. D., et al (Ed.). **Essentials of Glycobiology**. 2nd. Cold Spring Harbor (NY), 2009. ISBN 9780879697709.

WANG, J. et al. A nutrient-sensing pathway regulates leptin gene expression in muscle and fat. **Nature**, v. 393, n. 6686, p. 684-8, Jun 18 1998.

WANG, Z. V. et al. Spliced X-box binding protein 1 couples the unfolded protein response to hexosamine biosynthetic pathway. **Cell**, v. 156, n. 6, p. 1179-92, Mar 13 2014.

WEBER, D. S. et al. Phosphoinositide-dependent kinase 1 and p21-activated protein kinase mediate reactive oxygen species-dependent regulation of platelet-derived

growth factor-induced smooth muscle cell migration. **Circ Res**, v. 94, n. 9, p. 1219-26, May 14 2004.

WELLS, L. et al. Dynamic O-glycosylation of nuclear and cytosolic proteins: further characterization of the nucleocytoplasmic beta-N-acetylglucosaminidase, O-GlcNAcase. **J Biol Chem**, v. 277, n. 3, p. 1755-61, Jan 18 2002.

WELLS, L. et al. O-GlcNAc transferase is in a functional complex with protein phosphatase 1 catalytic subunits. **J Biol Chem**, v. 279, n. 37, p. 38466-70, Sep 10 2004.

WELLS, L.; VOSSELLER, K.; HART, G. W. Glycosylation of nucleocytoplasmic proteins: signal transduction and O-GlcNAc. **Science**, v. 291, n. 5512, p. 2376-8, Mar 23 2001.

WHITE, C. R. et al. Superoxide and peroxynitrite in atherosclerosis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 91, n. 3, p. 1044-8, Feb 1 1994.

WU, Y. T. et al. Mitochondrial respiratory dysfunction-elicited oxidative stress and posttranslational protein modification in mitochondrial diseases. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1201, p. 147-56, Jul 2010.

XING, D. et al. Increased protein O-GlcNAc modification inhibits inflammatory and neointimal responses to acute endoluminal arterial injury. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 295, n. 1, p. H335-42, Jul 2008.

XING, D. et al. Estradiol and progestins differentially modulate leukocyte infiltration after vascular injury. **Circulation**, v. 109, n. 2, p. 234-41, Jan 20 2004.

YANG, S. et al. Glucosamine administration during resuscitation improves organ function after trauma hemorrhage. **Shock**, v. 25, n. 6, p. 600-7, Jun 2006.

YANG, Z. W. et al. Hydrogen peroxide induces contraction and raises $[Ca^{2+}]_i$ in canine cerebral arterial smooth muscle: participation of cellular signaling pathways. **Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol**, v. 360, n. 6, p. 646-53, Dec 1999.

YAO, D. et al. High glucose increases angiopoietin-2 transcription in microvascular endothelial cells through methylglyoxal modification of mSin3A. **J Biol Chem**, v. 282, n. 42, p. 31038-45, Oct 19 2007.

YUZWA, S. A. et al. A potent mechanism-inspired O-GlcNAcase inhibitor that blocks phosphorylation of tau in vivo. **Nat Chem Biol**, v. 4, n. 8, p. 483-90, Aug 2008.

ZACHARA, N. E. The roles of O-linked beta-N-acetylglucosamine in cardiovascular physiology and disease. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 302, n. 10, p. H1905-18, May 15 2012.

ZACHARA, N. E.; HART, G. W. Cell signaling, the essential role of O-GlcNAc! **Biochim Biophys Acta**, v. 1761, n. 5-6, p. 599-617, May-Jun 2006.

ZACHARA, N. E. et al. Dynamic O-GlcNAc modification of nucleocytoplasmic proteins in response to stress. A survival response of mammalian cells. **J Biol Chem**, v. 279, n. 29, p. 30133-42, Jul 16 2004.

ZOU, L. et al. The protective effects of PUGNAc on cardiac function after trauma-hemorrhage are mediated via increased protein O-GlcNAc levels. **Shock**, v. 27, n. 4, p. 402-8, Apr 2007.

APÊNDICE

Apêndice A – Confirmação da inviabilidade de detecção da proteína GFAT em artérias mesentéricas humanas

Figura Apêndice A – Confirmação da inviabilidade de detecção da proteína GFAT em artérias mesentéricas humanas. A técnica de western blotting não possibilitou a identificação de GFAT em artérias mesentéricas humanas. Células HEK295 foram utilizadas como controle positivo para o anticorpo para GFAT1 (Ab125069).

Apêndice B – Parâmetros moleculares observados em artérias do subgrupo Após Isolamento e Veículo nos grupos Controle e Hipertenso.

Figura Apêndice B – Parâmetros moleculares observados em artérias do subgrupo Após Isolamento e Veículo nos grupos Controle e Hipertenso. (A), quantificação de O-GlcNAc nas diferentes condições experimentais no grupo Controle; (B), atividade enzimática de OGA nas diferentes condições experimentais no grupo Controle; (C), quantificação de proteínas modificadas por O-GlcNAc nas diferentes condições experimentais no grupo Hipertenso; (D), atividade enzimática de OGA nas diferentes condições experimentais no grupo Hipertenso. Os valores foram calculados em relação ao momento Após Isolamento do grupo Controle, considerado como valor arbitrário 1. A significância dos dados foi determinada pelo teste não-paramétrico de Mann-Whitney ($p = 0,2$ e $U = 5$ para A; $p = 0,1$ e $U = 2$ para B; $p = 0,7$ e $U = 8$ para C; $p = 0,4$ e $U = 10$ para D).

Apêndice C – Respostas moleculares e reatividade vascular ao tratamento com TMG 1 μ M no grupo Controle.

Figura Apêndice C – Respostas moleculares e reatividade vascular ao tratamento com TMG 1 μ M no grupo Controle. (A), quantificação de proteínas modificados por O-GlcNAc nas diferentes condições experimentais; (B), atividade enzimática de OGA nas diferentes condições experimentais; os valores de (A) e (B) foram calculados em relação ao subgrupo Após Isolamento, considerado como valor arbitrário 1. A significância dos dados foi determinada pelo teste ANOVA não-paramétrico de Kruskal-Wallis ($p = 0,006$; KW = 8,7 para A e $p = 0,002$; KW = 10,2 para B), seguido do pós-teste de Dunn para comparações múltiplas em relação ao controle. (C), Curvas concentração-resposta à NA para os subgrupos Após Isolamento, Veículo e após tratamento com TMG 1 μ M por 24 h (Thiamet G 1 μ M); (D), Curvas concentração-resposta ao NPS para os subgrupos Após Isolamento, Veículo e Thiamet G 1 μ M. Os valores experimentais de contração ou de relaxamento arterial foram calculados em relação à resposta contrátil máxima por KCl (120 mM), considerada 100%. Os resultados são apresentados como média $\pm$ EPM de cada grupo experimental, # $p < 0,05$ Veículo vs. Após Isolamento (C), * $p < 0,05$ Veículo vs. Após Isolamento (D). A significância dos dados foi determinada por meio do teste ANOVA não-paramétrico de Kruskal-Wallis ($p = 0,006$; KW = 8,8 para C e $p = 0,009$; KW = 7,1 para D). * referente a diferença significativa em $E_{m\acute{a}x}$ e # referente a diferença significativa na pD_2 .

Apêndice D – Geração de EROs no grupo Controle, antes e após tratamento com TMG e Veículo.

Figura Apêndice D – Geração de EROs no grupo Controle, antes e após tratamento com TMG e Veículo. Fluorescência por di-hidroetídio determinada em artérias mesentéricas do grupo Controle. Gráfico demonstra a quantificação da geração de EROs no grupo Controle, antes e após tratamento com TMG 100 μ M e seu Veículo, respectivamente. Os valores foram calculados em relação ao subgrupo Após Isolamento, considerado como valor arbitrário 1. Não foram observadas diferenças significativas entre os dados pelo teste de Kruskal-Wallis ($p = 0,21$ e $KW = 3,243$).

Apêndice E – Identificação das amostras usadas nas imagens representativas de western blotting.

Tabela Apêndice E – Identificação das amostras usadas nas imagens representativas de western blotting.

Figura	Grupo	Amostra
Figura 4.1.1 A	Controle	T78
Figura 4.1.1 B	Controle	T68
Figura 4.2.1 A	Controle - Após Isolamento	T79
	Controle - Thiamet G 100 μ M	T73
	Controle - PUGNAc 10 μ M	T73
	Controle - Após Isolamento	T78
Figura 4.2.2	Controle - Thiamet G 100 μ M	T46
	Controle - PUGNAc 10 μ M	T46
	Controle - Após Isolamento	T79
Figura 4.2.3	Controle - Thiamet G 100 μ M	T73
	Controle - PUGNAc 10 μ M	T73
	Hipertenso - Após Isolamento	T45
Figura 4.3.1	Hipertenso - Thiamet G 100 μ M	T45
	Hipertenso - PUGNAc 10 μ M	T45
	Hipertenso - Após Isolamento	T45
Figura 4.3.2	Hipertenso - Thiamet G 100 μ M	T45
	Hipertenso - PUGNAc 10 μ M	T45
	Hipertenso - Após Isolamento	T45
Figura 4.3.3	Hipertenso - Thiamet G 100 μ M	T45
	Hipertenso - PUGNAc 10 μ M	T45
	Hipertenso - Após Isolamento	T45
Figura 4.5.1	Controle - Após Isolamento	T38
	Controle - Thiamet G 100 μ M	T38
Figura 4.5.2	Hipertenso - Após Isolamento	T23
	Hipertenso - Thiamet G 100 μ M	T25
Figura Apêndice A	Controle	T10 / T35
		T37 / T38
	Hipertenso	T14 / T15 / T16
		T20 / T27
Figura Apêndice D	Controle - Após Isolamento	T38
	Controle - Thiamet G 100 μ M	T38
	Controle - Veículo	T38

Indicadas as amostras utilizadas na composição de cada uma das figuras representativas apresentadas nesse trabalho.

Apêndice F – Diferentes tratamentos para controle da HAS utilizados pelos pacientes participantes do grupo Hipertenso

Tabela Apêndice F – Diferentes tratamentos para controle da HAS utilizados pelos pacientes participantes do grupo Hipertenso.

Participantes	Medicação 1	Medicação 2	Medicação 3	Medicação 4
T02	<i>Losartana - 50 mg a cada 24 h</i>	<i>Anlopidina - 5 mg a cada 24 h</i>	<i>Hidroclorotiazida - 25 mg a cada 24 h</i>	<i>Sertralina - 25 mg a cada 24 h</i>
T04	<i>Dieta com restrição de sódio</i>	...	...	...
T12	<i>Captopril - 25 mg a cada 8 h</i>	<i>Losartana - 50 mg a cada 12 h</i>	<i>Clonazepam - 0,5 mg a cada 24 h</i>	...
T14	<i>Atenolol - 25 mg a cada 12 h</i>	<i>Hidroclorotiazida - 50 mg a cada 24 h</i>	...	...
T15	<i>Losartana - 50 mg a cada 24 h</i>	<i>Levotiroxina - 75µg a cada 24</i>	...	...
T16	<i>Anlopidina - 5 mg a cada 24 h</i>	<i>Hidroclorotiazida - 25 mg a cada 24 h</i>	<i>Metoprolol - 50 mg a cada 12 h</i>	<i>Sinvastatina - 20 mg a cada 24 h</i>
T20	<i>Atenolol - 25 mg a cada 24 h</i>	<i>Hidroclorotiazida - 25 mg a cada 24 h</i>	<i>Sinvastatina - 20 mg a cada 24 h</i>	<i>Levotiroxina - 75 µg a cada 24</i>
T23	<i>Enalapril - 20 mg a cada 12 h</i>	<i>Levotiroxina - 50 µg a cada 24 h</i>	<i>Sertralina - 50 mg a cada 24h</i>	<i>Sinvastatina - 20 mg a cada 24 h</i>
T25	<i>Enalapril - 10 mg a cada 24 h</i>	<i>Fluoxetina - 20 mg a cada 24 h</i>	...	...
T27	<i>Dieta com restrição de sódio</i>	<i>Clortalidona - 12,5 mg a cada 24 h</i>	<i>Omeprazol - 20 mg a cada 24 h</i>	...
T36	<i>Enalapril - 20 mg a cada 12 h</i>	<i>Carvedilol - 20 mg a cada 12 h</i>	<i>Sinvastatina - 20 mg a cada 24 h</i>	<i>Ácido Acetil Salicílico - 100 mg a cada 24 h</i>
T45	<i>Losartana - 50 mg a cada 24 h</i>	...	...	...
T51	<i>Enalapril - 10 mg a cada 12 h</i>	<i>Hidroclorotiazida - 25 mg a cada 24 h</i>	<i>Atenolol - 50 mg a cada 12 h</i>	<i>Anlopidina - 10mg a cada 24 h</i>
T64	<i>Losartana - 50 mg a cada 12 h</i>	<i>Hidroclorotiazida - 25 mg a cada 24 h</i>	...	...
T69	<i>Losartana - 50 mg a cada 12 h</i>	<i>Omeprazol - 20 mg a cada 24 h</i>	...	...
T72	<i>Losartana - 50 mg a cada 24 h</i>	...	...	...
T75	<i>Enalapril - 20 mg a cada 24h</i>	...	...	...
T87	<i>Losartana - 50 mg a cada 12 h</i>	<i>Atenolol - 25 mg a cada 12 h</i>	<i>Levotiroxina - 50 µg a cada 24 h</i>	<i>Fluoxetina - 20 mg a cada 24 h</i>

Lista de medicações utilizadas por cada participante do trabalho quando da coleta das amostras. Em destaque estão as medicações anti-hipertensivas. Considerando apenas as medicações anti-hipertensivas, os 18 participantes do trabalho seguem 15 tratamentos diferentes.

Apêndice G – Termo de consentimento Livre e Esclarecido do grupo Controle

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Participante do Grupo Controle

Projeto de pesquisa:

Modificação de proteínas por O-GlcNAc em artérias humanas: alterações na hipertensão arterial

Pesquisador principal: Thiago Braidó Dias

E-mail: thiagobdiascontato@gmail.com

Fone: (16) 3602-2211

(17)99135-2714

Nome do paciente: _____ Data: _____

RG-HC do Prontuário Médico: _____

Você é convidado(a) a participar de uma pesquisa sobre Hipertensão Arterial Sistêmica (Pressão Alta), na qual você fará parte do Grupo Controle.

Nessa pesquisa estudamos as lesões que a pressão alta pode causar nas artérias do corpo humano. Assim é possível conhecer melhor a doença e, portanto, oferecer novas possibilidades de diagnóstico e tratamento. Esse trabalho envolve a busca de novas informações sobre a pressão alta que podem ajudar no desenvolvimento de novos tratamentos no futuro.

A Pressão Alta é responsável pela morte de milhões de pessoas no mundo todo. Está relacionada com infarto do coração, acidente vascular cerebral (AVC), insuficiência renal entre outras doenças. O objetivo dessa pesquisa é descobrir novas formas como a doença afeta as artérias do nosso corpo. Essas informações podem ajudar outros pesquisadores a desenvolver novos tratamentos para a Hipertensão Arterial.

Rubrica pesquisador: _____

Versão 5 – 17/11/2016

Rubrica participante: _____

Rubrica pesquisador: _____

Rubrica participante: _____

Como você não possui a doença estudada, Hipertensão Arterial, é importante sua participação para compararmos as diferenças entre pessoas com a doença e pessoas sem a doença.

Você é admitido(a) neste hospital para o tratamento de uma possível doença proctológica. Como parte de seu tratamento, você será submetido a uma cirurgia. Durante a cirurgia são retirados fragmentos que são utilizados em exames clínico-laboratoriais, necessários para um diagnóstico definitivo. O restante do material torna-se sem utilidade.

Durante o procedimento cirúrgico, pequena quantidade de sangue será retirada de uma veia do braço que será utilizada no estudo. Na cirurgia, uma parte do seu intestino será retirada para os exames clínicos-laboratoriais e o diagnóstico de sua doença. Dessa parte do intestino será coletado um pequeno pedaço da artéria que leva sangue para essa área, esse pequeno pedaço será usado na pesquisa.

Não será realizado nenhum procedimento adicional a você para a obtenção desse fragmento. Não causará nenhum desconforto adicional, não aumentará o tempo de cirurgia, ou o tamanho da cirurgia. A coleta desse material não aumentará os riscos da cirurgia e não afetará o diagnóstico de sua doença. No entanto, há um risco mínimo de vazamento de suas informações pessoais referentes aos seus atendimentos neste hospital.

Como forma de reduzir esses riscos, este fragmento de tecido, sangue e suas informações, serão identificados no laboratório por um código formado por números e letras e, portanto, sua privacidade e identidade serão preservadas. A eventual inclusão dos resultados em publicação científica será feita de modo a manter o seu anonimato.

O material adquirido após a cirurgia será submetido a uma série de experimentos no laboratório de Farmacologia Cardiovascular do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. Posteriormente o material será enviado para os Estados Unidos, laboratório de Química Biológica da Universidade Johns Hopkins, onde experimentos únicos no mundo poderão ser realizados.

Com essa pesquisa esperamos entender melhor como a doença Hipertensão Arterial funciona e como ela lesa as artérias de nosso corpo. Com essas informações, futuramente, outros pesquisadores poderão desenvolver novas medicações e tratamentos para a Pressão Alta e muitas pessoas podem ser salvas no futuro.

Rubrica pesquisador: _____

Rubrica participante: _____

Todos envolvidos na pesquisa estarão sempre disponíveis para esclarecimento de quaisquer dúvidas que o paciente possa ter a respeito da pesquisa realizada antes e durante a realização da mesma.

Concordando com a retirada e uso destes fragmentos de artéria e sangue, do modo descrito, é necessário esclarecer que você não terá quaisquer benefícios ou direitos financeiros sobre eventuais resultados decorrentes da pesquisa. Garantimos sigilo e a privacidade de seus dados confidenciais envolvidos nesta pesquisa.

Se você não concordar em doar o fragmento da peça cirúrgica para pesquisa, ou caso queira sair da pesquisa em qualquer momento, sua decisão não influenciará, de nenhum modo, o seu tratamento. Basta entrar em contato com o pesquisador principal e notificar sua vontade.

Como a coleta da amostra será realizada apenas durante internação para realização do procedimento cirúrgico, nenhuma despesa adicional será necessária por parte do paciente participante ou de seus acompanhantes. Caso os pesquisadores solicitem o retorno do paciente e/ou acompanhante ao hospital por motivos relacionados a pesquisa, suas despesas referentes a transporte e alimentação serão ressarcidas pelo projeto de pesquisa.

Caso o(a) participante da pesquisa sofra eventuais danos decorrentes da pesquisa, o mesmo receberá as garantias previstas de assistência integral, gratuita e pelo tempo que for necessário, e tem direito a indenização por danos recorrentes da pesquisa, cujo mérito será julgado em sua instância adequada, conforme as leis vigentes no país.

Caso haja a necessidade de realizar outra pesquisa e ou procedimento com a sua amostra, não prevista nesse projeto até o momento, será feito um Novo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido específico para essa finalidade. Nenhum procedimento adicional será realizado com sua amostra sem seu prévio consentimento.

Eventualmente sua amostra será transportada do laboratório de Farmacologia do Brasil para o laboratório colaborador nos Estados Unidos. Você será notificado antes que esse transporte aconteça, por meio de correspondência, e-mail ou contato telefônico. Assim como todas as demais vezes que sua amostra for transferida para outro laboratório.

Você será informado caso ocorra a perda ou destruição de sua amostra biológica, ou quando a pesquisa for encerrada. A previsão para o encerramento da pesquisa é julho de 2022, quando todas as amostras remanescentes serão descartadas preservando a privacidade de suas informações.

Rubrica pesquisador: _____

Rubrica participante: _____

Você receberá uma via deste documento e o original será arquivado com os dados da pesquisa.

Caso você tenha questões a fazer sobre este documento ou alguma dúvida que não tenha sido esclarecida pelo pesquisador com relação a pesquisa realizada, por gentileza, entre em contato com a Comissão de Ética em Pesquisa do HCFMRP-USP (fone: 3602-2228).

Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP-USP de acordo com o processo HCRP Nº 14189/2012.

Contato CEP HCFMRP-USP:

Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP

Campus Universitário S/N Ribeirão Preto – SP – CEP: 14048-900

Telefone: 3602-2228

E-mail: cep@hcrp.fmrp.usp.br

Contato CONEP:

SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde, Bairro Asa Norte, Brasília, DF

Telefone: (61)3315-5878

E-mail: conep@saude.gov.br

Rubrica pesquisador: _____

Rubrica participante: _____

Dados do pesquisador:

Nome legível: _____

Telefone: _____

Assinatura: _____

Data: ____/____/____

Dados do Participante:

Nome legível: _____

Assinatura: _____

Data: ____/____/____

Dados do responsável legal ou testemunha (caso aplicável):

Nome legível: _____

Assinatura: _____

Data: ____/____/____

Apêndice H – Termo de consentimento Livre e Esclarecido do grupo Hipertenso

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Participante do Grupo Hipertenso

Projeto de pesquisa:

Modificação de proteínas por O-GlcNAc em artérias humanas: alterações na hipertensão arterial

Pesquisador principal: Thiago Braido Dias

E-mail: thiagobdiascontato@gmail.com

Fone: (16) 3602-2211

(17)99135-2714

Nome do paciente: _____ Data: _____

RG-HC do Prontuário Médico: _____

Você é convidado(a) a participar de uma pesquisa sobre Hipertensão Arterial Sistêmica (Pressão Alta), na qual você fará parte do Grupo Hipertenso.

Nessa pesquisa estudamos as lesões que a pressão alta pode causar nas artérias do corpo humano. Assim é possível conhecer melhor a doença e, portanto, oferecer novas possibilidades de diagnóstico e tratamento. Esse trabalho envolve a busca de novas informações sobre a pressão alta que podem ajudar no desenvolvimento de novos tratamentos no futuro.

A Pressão Alta é responsável pela morte de milhões de pessoas no mundo todo. Está relacionada com infarto do coração, acidente vascular cerebral (AVC), insuficiência renal entre outras doenças. O objetivo dessa pesquisa é descobrir novas formas como a doença afeta as artérias do nosso corpo. Essas informações podem ajudar outros pesquisadores a desenvolver novos tratamentos para a Hipertensão Arterial.

Rubrica pesquisador: _____

Versão 5 – 17/11/2016

Rubrica participante: _____

Rubrica pesquisador: _____

Rubrica participante: _____

Como você possui a doença estudada, Hipertensão Arterial, é importante sua participação para compararmos as diferenças entre pessoas com a doença e pessoas sem a doença.

Você é admitido(a) neste hospital para o tratamento de uma possível doença proctológica. Como parte de seu tratamento, você será submetido a uma cirurgia. Durante a cirurgia são retirados fragmentos que são utilizados em exames clínico-laboratoriais, necessários para um diagnóstico definitivo. O restante do material torna-se sem utilidade.

Durante o procedimento cirúrgico, pequena quantidade de sangue será retirada de uma veia do braço que será utilizada no estudo. Na cirurgia, uma parte do seu intestino será retirada para os exames clínicos-laboratoriais e o diagnóstico de sua doença. Dessa parte do intestino será coletado um pequeno pedaço da artéria que leva sangue para essa área, esse pequeno pedaço será usado na pesquisa.

Não será realizado nenhum procedimento adicional a você para a obtenção desse fragmento. Não causará nenhum desconforto adicional, não aumentará o tempo de cirurgia, ou o tamanho da cirurgia. A coleta desse material não aumentará os riscos da cirurgia e não afetará o diagnóstico de sua doença. No entanto, há um risco mínimo de vazamento de suas informações pessoais referentes aos seus atendimentos neste hospital.

Como forma de reduzir esses riscos, este fragmento de tecido, sangue e suas informações, serão identificados no laboratório por um código formado por números e letras e, portanto, sua privacidade e identidade serão preservadas. A eventual inclusão dos resultados em publicação científica será feita de modo a manter o seu anonimato.

O material adquirido após a cirurgia será submetido a uma série de experimentos no laboratório de Farmacologia Cardiovascular do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. Posteriormente o material será enviado para os Estados Unidos, laboratório de Química Biológica da Universidade Johns Hopkins, onde experimentos únicos no mundo poderão ser realizados.

Com essa pesquisa esperamos entender melhor como a doença Hipertensão Arterial funciona e como ela lesa as artérias de nosso corpo. Com essas informações, futuramente, outros pesquisadores poderão desenvolver novas medicações e tratamentos para a Pressão Alta e muitas pessoas podem ser salvas no futuro.

Rubrica pesquisador: _____

Rubrica participante: _____

Todos envolvidos na pesquisa estarão sempre disponíveis para esclarecimento de quaisquer dúvidas que o paciente possa ter a respeito da pesquisa realizada antes e durante a realização da mesma.

Concordando com a retirada e uso destes fragmentos de artéria e sangue, do modo descrito, é necessário esclarecer que você não terá quaisquer benefícios ou direitos financeiros sobre eventuais resultados decorrentes da pesquisa. Garantimos sigilo e a privacidade de seus dados confidenciais envolvidos nesta pesquisa.

Se você não concordar em doar o fragmento da peça cirúrgica para pesquisa, ou caso queira sair da pesquisa em qualquer momento, sua decisão não influenciará, de nenhum modo, o seu tratamento. Basta entrar em contato com o pesquisador principal e notificar sua vontade.

Como a coleta da amostra será realizada apenas durante internação para realização do procedimento cirúrgico, nenhuma despesa adicional será necessária por parte do paciente participante ou de seus acompanhantes. Caso os pesquisadores solicitem o retorno do paciente e/ou acompanhante ao hospital por motivos relacionados a pesquisa, suas despesas referentes a transporte e alimentação serão ressarcidas pelo projeto de pesquisa.

Caso o(a) participante da pesquisa sofra eventuais danos decorrentes da pesquisa, o mesmo receberá as garantias previstas de assistência integral, gratuita e pelo tempo que for necessário, e tem direito a indenização por danos recorrentes da pesquisa, cujo mérito será julgado em sua instância adequada, conforme as leis vigentes no país.

Caso haja a necessidade de realizar outra pesquisa e ou procedimento com a sua amostra, não prevista nesse projeto até o momento, será feito um Novo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido específico para essa finalidade. Nenhum procedimento adicional será realizado com sua amostra sem seu prévio consentimento.

Eventualmente sua amostra será transportada do laboratório de Farmacologia do Brasil para o laboratório colaborador nos Estados Unidos. Você será notificado antes que esse transporte aconteça, por meio de correspondência, e-mail ou contato telefônico. Assim como todas as demais vezes que sua amostra for transferida para outro laboratório.

Você será informado caso ocorra a perda ou destruição de sua amostra biológica, ou quando a pesquisa for encerrada. A previsão para o encerramento da pesquisa é julho de 2022, quando todas as amostras remanescentes serão descartadas preservando a privacidade de suas informações.

Rubrica pesquisador: _____

Rubrica participante: _____

Você receberá uma via deste documento e o original será arquivado com os dados da pesquisa.

Caso você tenha questões a fazer sobre este documento ou alguma dúvida que não tenha sido esclarecida pelo pesquisador com relação a pesquisa realizada, por gentileza, entre em contato com a Comissão de Ética em Pesquisa do HCFMRP-USP (fone: 3602-2228).

Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP-USP de acordo com o processo HCRP Nº 14189/2012.

Contato CEP HCFMRP-USP:

Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP

Campus Universitário S/N Ribeirão Preto – SP – CEP: 14048-900

Telefone: 3602-2228

E-mail: cep@hcrp.fmrp.usp.br

Contato CONEP:

SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde, Bairro Asa Norte, Brasília, DF

Telefone: (61)3315-5878

E-mail: conep@saude.gov.br

Rubrica pesquisador: _____

Rubrica participante: _____

Dados do pesquisador:

Nome legível: _____

Telefone: _____

Assinatura: _____

Data: ____/____/____

Dados do Participante:

Nome legível: _____

Assinatura: _____

Data: ____/____/____

Dados do responsável legal ou testemunha (caso aplicável):

Nome legível: _____

Assinatura: _____

Data: ____/____/____