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

CAMILA ZILIOOTTO ZANOTTO

Papel do aumento agudo de *O*-glicosilação com *N*-acetil-glucosamina (*O*-GlcNAc) na liberação de mediadores inflamatórios e na função vascular de camundongos com endotoxemia.

RIBEIRÃO PRETO

2017

CAMILA ZILIOOTTO ZANOTTO

Papel do aumento agudo de *O*-glicosilação com *N*-acetil-glucosamina (*O*-GlcNAc) na liberação de mediadores inflamatórios e na função vascular de camundongos com endotoxemia.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Doutora em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

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

RIBEIRÃO PRETO

2017

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Zanotto, Camila Ziliotto

Papel do aumento agudo de *O*-glicosilação com *N*-acetil-glucosamina (*O*-GlcNAc) na liberação de mediadores inflamatórios e na função vascular de camundongos com endotoxemia. 2017.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP.
Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Tostes, Rita de Cássia Aleixo Passaglia

1. *O*-GlcNAc 2. Endotoxemia 3. Glicosilação 4. LPS 5. Mediadores inflamatórios 6. Vascular

FOLHA DE APROVAÇÃO

Camila Ziliotto Zanotto

Papel do aumento agudo de *O*-glicosilação com *N*-acetil-glucosamina (*O*-GlcNAc) na liberação de mediadores inflamatórios e na função vascular de camundongos com endotoxemia.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Doutora em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Aprovado em: ____ / ____ / ____

Banca examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Com os pais que tenho, *Pedro e Joice*

Com a irmã que tenho, *Júlia*

Com a família que tenho, *Ziliotto Zanotto*

Com a orientadora que tenho, *Rita*

Com os amigos que tenho... ♥

Com tudo que tenho

Dedico esta tese

a todos que me inspiram a sonhar cada vez mais

...

A vida, pela sorte que tenho!

Agradecimentos

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

A minha maravilhosa família:

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

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

Em especial, a Doutora *Vania Olivon*, que dedicou seu tempo para boas conversas, principalmente nos momentos de desespero, pela orientação no desenvolvimento deste trabalho, acreditando em mim. Minha admiração e gratidão por você é imensa... “*Some people appear in your life when you need them most. They love you and lift you up, reminding you of the best, even when you’re going through the worst. These people are not just friends, they are Earth angels.*”

Aos amigos mais chegados e preciosos *Camila Pereira, Karla Bianca, Rhéure Lopes, Nathanne Ferreira, Pedro Afonso, Edismauro Garcia e Ludmila Lima* que são sinônimo da minha família ribeirão-pretana, agradeço nossa amizade e cada momento que passamos juntos. E com carinho especial a *Brisa*, pela sua dedicação e zelo, por sua amizade ser sempre vigilante.

Paola Londero, nossa amizade chegou da forma mais inesperada possível, uma das histórias mais bonitas da minha vida e durante meu doutorado, você foi muito mais que só minha cozinheira, uma irmã que o doutorado me trouxe para o resto da vida!

Aos amigos *Carla & Marcelo, Larissa e Rosana*, a nossa amizade começou lá em Santa Maria, e vocês foram minha base aqui em Ribeirão. Obrigada por todos os momentos de descontração, pelo companheirismo e pelo ombro amigo.

Aos amigos de laboratório, *Fernando, Zidônia, Fabíola, Carla, Stêfany, Fernanda, Vania, Marcondes, Thiago Bruder, Thiago Dias, Karla, Rhéure, Camila, Nathanne, Josiane, Rafael Menezes, Rafael Fais, Aline, Juliano, Júlio, Diane, Allan, Sara e Emiliana* sou grata pelo convívio diário, vocês fazem deste laboratório um lar, obrigada por tudo (amizade, companheirismo, paciência, refeições diárias, experiências, ideias, ensinamentos, alegrias). Vocês são muito especiais e fizeram o laboratório ser único!

Ao professor Doutor *José Carlos Alves Filho*, pelas ideias e orientação essenciais durante a realização deste trabalho. E aos seus alunos *Daniele Nascimento, Rafael Ferreira, João Paulo e Douglas Prado* pela estrutura proporcionada para a realização e discussão dos experimentos.

Aos *amigos* que fiz em Ribeirão Preto.... pela amizade, carinho, sorrisos e convívio durante este período em Ribeirão Preto. Em especial, aos amigos que fiz durante a minha estadia aqui e que certamente deixaram marcas para o resto da minha vida. Nos encontraremos pelo mundo!

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

A todos os funcionários e técnicos do Departamento de Farmacologia, em especial *José Waldik Ramon, Fátima Helena, Gislaine* e a *Soninha*, que sempre estiveram prontos a ajudar e dar suporte em todas as causas burocráticas desta caminhada.

Ao apoio financeiro da CAPES, CNPq, FAPESP e CRID.

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

Camila

“O cientista não é o homem que fornece as verdadeiras respostas; é quem faz as verdadeiras perguntas”.

Claude Lévi-Strauss

“Nunca se afaste de seus sonhos, pois se eles se forem, você continuará vivendo, mas terá deixado de existir”.

Charles Chaplin

RESUMO

ZANOTTO, C.Z. **Papel do aumento agudo de *O*-glicosilação com *N*-acetil-glucosamina (*O*-GlcNAc) na liberação de mediadores inflamatórios e na função vascular de camundongos com endotoxemia.** 2017. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

A *O*-glicosilação com *N*-acetil-glucosamina (*O*-GlcNAc) é uma modificação pós-traducional altamente dinâmica, controlada por duas enzimas: a OGT, responsável por catalisar a adição de *N*-acetil-glucosamina no grupo hidroxila dos resíduos de serina e treonina; e a OGA, que catalisa a remoção de *O*-GlcNAc das proteínas modificadas. Condições crônicas de aumento de proteínas *O*-GlcNAc estão associadas a disfunções vasculares e a efeitos negativos no coração. No entanto, os efeitos agudos produzidos pelo aumento de *O*-GlcNAc estão associados a uma melhora na função cardíaca, redução dos níveis vasculares de mediadores pró-inflamatórios. Neste estudo testamos a hipótese que o aumento agudo da modificação por *O*-GlcNAc reduz os níveis sistêmicos de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , IL-6 e TNF- α , bem como a ativação do fator de transcrição NF- κ B, reduzindo o processo inflamatório e disfunção vascular em animais com endotoxemia. Foram utilizados camundongos C57BL6/J que receberam lipopolissacarídeo (LPS) para o desenvolvimento de endotoxemia severa (LPS sev, 20 mg/Kg, i.p.) ou veículo (controle). Os animais também receberam glucosamina (GlcN; 300 mg/Kg; i.v.; 30 min antes do LPS), ThG (150 μ g/Kg, i.v.; 12 h antes do LPS) ou veículo e foram sacrificados 6 horas após a indução da endotoxemia com LPS. Os tratamentos prévios com GlcN e ThG aumentaram a sobrevivência dos animais (50 % e 60 % na endotoxemia sev). A determinação dos níveis sistêmicos de IL-1 β , IL-6 e TNF- α e da expressão gênica vascular destas citocinas [mRNA ($2^{-\Delta\Delta CT}$) em aorta e leito mesentérico] demonstrou que os tratamentos prévios com GlcN e ThG reduziram a expressão de IL-1 β , IL-6 e TNF- α em animais com endotoxemia. O tratamento prévio com GlcN atenuou, mas não normalizou a hipotensão arterial causada pela endotoxemia por LPS. Não foram observadas alterações de reatividade na artéria aorta de animais que receberam LPS, ou LPS + GlcN. Entretanto, os tratamentos prévios com GlcN e ThG atenuaram a refratariedade a vasoconstrictores observada em artéria mesentérica de resistência de

animais que receberam somente LPS. O aumento dos níveis de proteínas glicosiladas, com GlcN e ThG, em cultura de macrófagos provenientes da medula óssea de camundongos C57BL6/J corroboram os resultados descritos acima. Os níveis de citocinas no sobrenadante da cultura de macrófagos, bem como a expressão gênica destas citocinas, e a produção de nitrito por estas células foram menores em células submetidas ao tratamento com GlcN e ThG. Além da endotoxemia por LPS, avaliamos os efeitos do tratamento com GlcN em um modelo de ligadura e perfuração do ceco (CLP) e os resultados corroboram os dados obtidos nos animais com endotoxemia e na cultura de macrófagos. Portanto, o aumento agudo da modificação por *O*-GlcNAc em animais com endotoxemia por LPS promove aumento da sobrevivência dos animais, redução nos níveis de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , IL-6 e TNF- α e redução da disfunção vascular e hipotensão arterial. **Conclusão:** Aumento agudo de *O*-GlcNAc reduz o processo inflamatório e atenua eventos cardiovasculares associados a endotoxemia por LPS, sugerindo que essa via representa um possível alvo em condições de resposta inflamatória sistêmica.

Palavras-chaves: *O*-GlcNAc, Endotoxemia, Glicosilação, LPS, Mediadores inflamatórios, Vascular.

ABSTRACT

ZANOTTO, C.Z. **Effects of acute increases on *O*-GlcNAcylation in the release of inflammatory mediators and vascular function in mice with endotoxemia.** 2017. Thesis (doctoral), Ribeirao Preto Medical School, University of Sao Paulo, Ribeirao Preto.

The post-translational modification of proteins by *O*-GlcNAcylation (*O*-GlcNAc) is highly dynamic and modulates cell-signaling processes. Chronic conditions that increase the levels of *O*-GlcNAc-modified proteins are associated with vascular disorders. However, acute increases in *O*-GlcNAc levels reduce the release of pro-inflammatory mediators and negatively regulate inflammatory processes by decreasing e.g. NF- κ B activation. This study tested the hypothesis that acute increases of *O*-GlcNAc levels reduce mortality and inflammatory processes in experimental models of sepsis. Male C57BL6/J mice received lipopolysaccharide (LPS) for the development of severe (LPS sev, 20 mg / kg, i.p.) endotoxemia or vehicle (control). Mice also received glucosamine (GlcN; 300 mg / kg, iv; 30 min) or ThG (150 μ g / kg, iv; 12 h) or vehicle before LPS administration. Mice were killed 6 hours after LPS. The acute increase of *O*-GlcNAc modification in animals with LPS-induced endotoxemia increased survival, reduced levels of proinflammatory cytokines such as IL-1 β , IL-6 and TNF- α and attenuated vascular dysfunction and arterial hypotension. Treatments with GlcN and ThG reduced IL-1 β , IL-6 and TNF- α [plasma levels and vascular gene expression [mRNA] ($2^{-\Delta\Delta CT}$) in the aorta and mesenteric bed] in animals with endotoxemia. GlcN and ThG also attenuated the decreased vasoconstrictor responses and hypotension induced by LPS. Increased levels of glycosylated proteins decreased levels (in the supernatant) and expression of cytokines in cultured bone marrow-derived macrophages from C57BL6/J mice. GlcN treatment produced similar effects in an experimental model that closely resembles human sepsis, the cecum ligation and perforation (CLP) model. Conclusion: Acute increase of *O*-GlcNAc reduces the inflammatory process and attenuates cardiovascular events associated with LPS endotoxemia, suggesting that this pathway represents a possible target under conditions of systemic inflammatory response.

Keywords: *O*-GlcNAc, Endotoxemia, Glycosylation, LPS, Inflammatory mediators, Vascular.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh	Acetilcolina
ACCP	<i>American College of Chest Physicians</i>
ANOVA	Análise de variância
Arg I e II	Arginase I e II
BSA	Albumina de soro bovina
Ca ²⁺	Cálcio
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CLP	Ligadura e perfuração do ceco
CMLV	Células de músculo liso vascular
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
COX-2	Ciclooxigenase-2
Ct	Ciclo limiar
DEPC	Dietil pirocarbonato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOCA	Acetato de desoxicorticosterona
DTT	Ditiotreitol
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
E _{max}	Efeito máximo produzido pelo agonista
eNOS	Isoforma endotelial da óxido nítrico sintase
EPM	Erro padrão da média
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
ESICM	<i>European Society of Intensive Care Medicine</i>

ET-1	Endotelina 1
GFAT	Glutamina:frutose-6-fosfato amidotransferase
GlcNAc	<i>N</i> -acetil-glucosamina
GlcN	Glucosamina
h	Horas
Hepes	Ácido 2-etanossulfónico
HRP	Enzima peroxidase
ICAM	Molécula de adesão intercelular I
IL-1 β	Interleucina-1 beta
IL-4	Interleucina-4
IL-6	Interleucina-6
IL-10	Interleucina-10
IL-12	Interleucina-12
IL-13	Interleucina-13
IL-23	Interleucina-23
ILAS	Instituto Latino Americano da Seps
iNOS	Isoforma induzível da óxido nítrico sintase
IFN- γ	Interferon-gama
IKB	Proteína inibitória kappa B
IRAK1	Proteína quinase 1 associada ao receptor de interleucina-1
IRAK4	Proteína quinase 4 associada ao receptor de interleucina-1
JNK	c-Jun N-terminal
KCl	Cloreto de potássio
L	Unidade de medida Litro
LCCM	Meio condicionado de células L929

LPS	Lipopolissacarídeo
M	Unidade de concentração Molar
M1	Macrófagos ativados classicamente
M2	Macrófagos ativados alternativamente
mg	Unidade de medida Miligrama
mL	Unidade de medida Mililitro
mM	Unidade de concentração Milimolar
mN	Unidade de força Milinewton
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
M-CSF	Fator estimulador de colônias de macrófagos
min	Minutos
MLC	Cadeia leve miosina
MPTs	Modificações pós-traducionais
MPO	Enzima mieloperoxidase
mRNA	RNA mensageiro
MR	Receptor de manose
MTT	3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5 brometo de difenil tetrazólio
MyD88	Fator 88 de diferenciação mieloide
MYPT-1	Subunidade 1 da miosina fosfatase
mN	Unidade de medida de força Milinewton
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NO	Óxido nítrico
nNOS	Isoforma neuronal da óxido nítrico sintase
NP-40	Nonidet P-40
O ou O ₂	Oxigênio

OGA	β - <i>N</i> -acetilglucosaminidase ou <i>O</i> -GlcNAcase
<i>O</i> -GlcNAc	Glicosilação com <i>N</i> -acetil-glucosamina
OGT	<i>O</i> -GlcNAc transferase
PAM	Pressão arterial média
PAMP	Padrões moleculares associados a patógenos
PBS	Tampão salina-fosfato
PCR-RT	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
pD_2	Logaritmo negativo da concentração de uma droga que induz 50 % do efeito máximo
PE	Fenilefrina
PIP3	Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato
PKC	Proteína quinase C
PMSF	Fenil-metil-sulfonil-fluoreto
PugNAc	<i>O</i> -(2-aceta-mido-2-deoxi- <i>D</i> -glicopiranosilidina) amino- <i>N</i> -fenilcarbamato
PVAT	Tecido adiposo perivascular
RLU	Unidades relativas de luz
ROC	<i>receiver operator characteristic</i>
RNA	Ácido ribonucléico
rpm	Rotações por minuto
S	Enxofre
Ser	Serina
seg	Segundos
SFB	Soro fetal bovino
SCCM	<i>Society of Critical Care Medicine</i>
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio

SIRS	Síndrome de resposta inflamatória sistêmica
SOFA	<i>Sequential Organ Failure Assessment</i>
ThG	Thiamet-G
Thr	Treonina
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α
TLR-2	Receptor do tipo <i>toll</i> 2
TLR-4	Receptor do tipo <i>toll</i> 4
UDP-GlcNAc	Uridina 5'-difosfato- <i>N</i> -acetilglucosamina
UTI	Unidade de terapia intensiva
VBH	Via de biossíntese das hexosaminas
VCAM	Molécula de adesão células vasculares
μ M	Unidade de concentração Micromolar

LISTA DE FÓRMULAS

CO_2	Dióxido de carbono
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Cloreto de cálcio diidratado
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGTA	Ácido bis(2-aminoetil) etilenoglicol-N,N,N',N'-tetraacético
H^+	Íons hidrogênio
H_2O	Água
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
KCl	Cloreto de potássio
KH_2PO_4	Fosfato de potássio monobásico
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de magnésio heptahidratado
NaCl	Cloreto de sódio
NaF	Fluoreto de sódio
NaNO_2	Nitrito de sódio
Na_3VO_4	Ortovanadato de sódio
NaHCO_3	Bicarbonato de sódio
NO_2^-	Nitrito
O_2	Oxigênio
$\text{O}_2^{\cdot -}$	Ânion superóxido
SDS	Dodecil sulfato de sódio

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista de anticorpos primários e respectivos anticorpos secundários.	60
Tabela 2. Tratamento com GlcN não altera valores de Emax e pD ₂ para PE e ACh em aorta de camundongos controle e com endotoxemia severa.....	82
Tabela 3. Efeito do tratamento com GlcN sobre os valores de Emax e pD ₂ para PE e ACh em artéria mesentérica de camundongos controle e com endotoxemia severa.	84

LISTA DE FIGURAS

Esquema 1. Esquema ilustrativo da hipótese de trabalho.	43
Figura 1. Via de biossíntese das hexosaminas.....	28
Figura 2. Expressão de proteínas glicosiladas em artéria aorta de camundongos dos grupos controle (salina) e tratados com glucosamina.....	70
Figura 3. Expressão de proteínas glicosiladas em artéria aorta de camundongos dos grupos controle (salina) e tratados com Thiamet-G.	71
Figura 4. GlcN diminui a migração de neutrófilos para a cavidade abdominal em animais submetidos à endotoxemia por LPS.	73
Figura 5. ThG diminui a migração de neutrófilos para a cavidade abdominal em animais submetidos à endotoxemia por LPS... ..	73
Figura 6. GlcN reduz o sequestro de neutrófilos no pulmão de animais submetidos à endotoxemia severa por LPS.	75
Figura 7. ThG reduz o sequestro de neutrófilos no pulmão de animais submetidos à endotoxemia severa por LPS.	75
Figura 8. O tratamento com GlcN reduz liberação de citocinas sistêmicas.. ..	77
Figura 9. O tratamento com ThG reduz liberação de citocinas sistêmicas.....	77
Figura 10. O tratamento com GlcN reduz a expressão gênica de citocinas em aorta e leito mesentérico de animais com endotoxemia.	79
Figura 11. O tratamento com ThG reduz a expressão gênica das citocinas em aorta e leito mesentérico de animais com endotoxemia.	80
Figura 12. O tratamento com GlcN atenua a hipotensão arterial na endotoxemia por LPS.	81
Figura 13. Não ocorrem alterações de reatividade vascular em aorta 6 h após indução de endotoxemia por LPS.	82

Figura 14. O tratamento com GlcN aumenta a resposta contrátil a PE após 6 h de indução de endotoxemia por LPS.	83
Figura 15. Efeito do tratamento com GlcN sobre os valores de Emax e pD ₂ para PE e ACh em artéria mesentérica.	84
Figura 16. O tratamento com GlcN aumenta a sobrevida de animais submetidos à indução de endotoxemia severa por LPS.	86
Figura 17. O tratamento com ThG aumenta a sobrevida de animais submetidos à indução de endotoxemia severa por LPS.	86
Figura 18. O tratamento com GlcN aumenta a sobrevida de animais submetidos à CLP.	90
Figura 19. Avaliação da migração de neutrófilos para a cavidade abdominal em animais submetidos à CLP e tratados com GlcN.	92
Figura 20. Avaliação do sequestro de neutrófilos no pulmão em animais submetidos à CLP tratados com GlcN.	92
Figura 21. O tratamento com GlcN reduz níveis sistêmicos da citocina IL-6.	93
Figura 22. O tratamento com GlcN e ThG reduz a expressão gênica da iNOS em leito mesentérico de animais com endotoxemia.	96
Figura 23. Os tratamentos com GlcN e ThG diminuem os níveis sistêmicos de nitrito em animais com endotoxemia por LPS.	97
Figura 24. O tratamento com GlcN reduz a liberação IL-1 β em sobrenadante de cultura de macrófagos.	99
Figura 25. O tratamento com GlcN reduz a expressão gênica das citocinas em cultura de macrófagos estimulados com LPS.	99
Figura 26. O tratamento com ThG reduz a liberação de citocinas pró-inflamatórias em sobrenadante de cultura de macrófagos.	100

Figura 27. O tratamento com ThG reduz a expressão gênica de citocinas em cultura de macrófagos estimulados com LPS.....	100
Figura 28. GlcN e ThG reduz ativação do NF- κ B induzida por LPS.	102
Figura 29. O-GlcNAc inibe a translocação induzida por LPS da subunidade p65 do NF- κ B para o núcleo.....	103
Figura 30. Compostos utilizados no estudo não alteram a viabilidade celular, verificada pelo método de redução do MTT.	105
Figura 31. ThG e GlcN promovem aumento tempo-dependente da expressão de proteínas O-GlcNAc em macrófagos.	106
Figura 32. Expressão das enzimas OGA e OGT em macrófagos estimulados com ThG e GlcN.	107
Figura 33. Marcação de macrófagos M1 e M2 por citometria de fluxo.....	109
Figura 34. Marcação de macrófagos M1 e M2 por citometria de fluxo.....	110
Figura 35. Macrófagos estimulados com ThG e GlcN apresentam maior marcação para iNOS, marcador de macrófagos M1.....	112
Figura 36. Macrófagos estimulados com ThG e GlcN apresentam redução da marcação do receptor MR, marcador de macrófagos M2.....	112
Figura 37. Representação esquemática dos achados deste trabalho.....	127

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	26
<i>O</i> -glicosilação com <i>N</i> -acetil-glucosamina (<i>O</i> -GlcNAc)	26
Sepse e Resposta Inflamatória	29
<i>O</i> -GlcNAc, Sistema Cardiovascular e o Processo Inflamatório	36
2 HIPÓTESE.....	42
3 OBJETIVOS	45
4 MATERIAIS E MÉTODOS	47
4.1 Cultura de macrófagos – <i>in vitro</i>	47
4.1.1 Animais	47
4.1.2 Preparo e diferenciação dos macrófagos derivados da medula óssea	47
4.1.3 Ferramenta farmacológica para aumento das proteínas glicosiladas por <i>O</i> -GlcNAc em macrófagos	48
4.1.4 Citometria de fluxo.....	49
4.2 Modelo Experimental - <i>in vivo</i>	50
4.2.1 Animais	50
4.2.2 Ferramentas farmacológicas para aumento dos níveis de proteínas glicosiladas <i>in vivo</i>	50
4.2.3 Modelo de endotoxemia por LPS	51
4.2.4 Modelo de sepse – CLP.....	52
4.2.5 Curva de Sobrevida	53
4.2.6 Contagem total e diferencial de células.....	53
4.2.7 Determinação da atividade da mieloperoxidase no pulmão	54
4.2.8 Registro da Pressão Arterial Média.....	55
4.2.9 Estudo de reatividade vascular em Aorta e Artérias Mesentéricas de Resistência.....	55
4.3 Protocolos moleculares	58
4.3.1 Avaliação da viabilidade celular	58
4.3.2 Determinação da expressão proteica por <i>western blot</i>	59
4.3.3 Expressão gênica pela reação em cadeia da polimerase (PCR)	60
4.3.4 Dosagem de citocinas.....	63
4.3.5 Quantificação da produção de óxido nítrico – ensaio de Griess	64

4.3.6 Ensaio de luciferase em macrófagos RAW-luc estavelmente transfectados com o gene NF- κ B	65
4.3.7 Fracionamento do extrato citosólico e nuclear.....	66
4.4 Análise Estatística.....	67
5 RESULTADOS	69
5.1 Expressão dos níveis de proteínas glicosiladas.....	69
5.1.1 Expressão de proteínas glicosiladas em aorta de camundongos controle tratados com GlcN ou veículo.....	69
5.1.2 Expressão de proteínas glicosiladas em aorta de camundongos controle tratados com ThG ou veículo.....	70
5.2 Resposta inflamatória.....	72
5.2.1 Efeito do aumento de <i>O</i> -GlcNAc no recrutamento de neutrófilos para a cavidade abdominal.....	72
5.2.2 Efeito do aumento de <i>O</i> -GlcNAc no sequestro de neutrófilos pelo pulmão..	74
5.2.3 Efeito do aumento de <i>O</i> -GlcNAc na liberação sistêmica de mediadores inflamatórios.....	76
5.3 Resposta no sistema cardiovascular.....	81
5.3.1 Efeito do aumento de <i>O</i> -GlcNAc na hipotensão observada nos animais com endotoxemia por LPS	81
5.3.2 Efeito do aumento de <i>O</i> -GlcNAc na reatividade vascular	82
5.3.3 Efeitos do tratamento com GlcN e ThG na sobrevida dos animais submetidos a endotoxemia por LPS	85
5.4 Efeitos do tratamento com GlcN nos animais com CLP	89
5.5 Mecanismos envolvidos nos efeitos do aumento de <i>O</i> -GlcNAc em animais com endotoxemia por LPS.....	95
5.5.1 Efeito do aumento de <i>O</i> -GlcNAc na expressão gênica vascular da isoforma induzível da óxido nítrico sintase (iNOS) em leito mesentérico.....	95
5.5.2 Efeito do aumento de <i>O</i> -GlcNAc nos níveis sistêmicos de nitrito (quantificação indireta de NO) em animais com endotoxemia por LPS.....	96
5.6 Efeito do aumento de proteínas glicosiladas em cultura de macrófagos	98
5.6.1 Efeito do aumento de <i>O</i> -GlcNAc na liberação e expressão de mediadores inflamatórios em macrófagos estimulados com LPS	98
5.7 Perfil de diferenciação e ativação dos macrófagos	105
5.7.1 Avaliação da viabilidade celular	105
5.7.2 Avaliação do efeito do ThG e GlcN nos níveis de proteínas <i>O</i> -GlcNAc e enzimas da via da Hexosamina em macrófagos.....	106

5.7.3 Caracterização da diferenciação de macrófagos	108
5.7.4 Avaliação do aumento de proteínas <i>O</i> -GlcNAc na polarização dos macrófagos	110
6 DISCUSSÃO	115
7 CONCLUSÃO.....	129
8 REFERÊNCIAS	131
9 ANEXOS	139

Introdução

1 INTRODUÇÃO

***O*-glicosilação com *N*-acetil-glucosamina (*O*-GlcNAc)**

Acreditava-se que as proteínas glicosiladas ao serem sintetizadas eram direcionadas para compartimentos luminais ou extracelulares, até que, em 1984, foi relatado pela primeira vez, por Torres e Hart, um novo tipo de glicosilação com o carboidrato *N*-acetil-glucosamina (GlcNAc) ligado a proteínas localizadas no citosol e em organelas de diversos linfócitos (TORRES; HART, 1984). Após este trabalho, surgiram evidências que a ligação de *N*-acetil-glucosamina ao oxigênio da hidroxila (*O*) da cadeia lateral de alguns aminoácidos possui papel funcional ou significado biológico. Esta glicosilação foi denominada em inglês *O*-GlcNAcylation (LIMA et al., 2012) ou, após tradução ao português, *O*-GlcNAcilação e neste trabalho será doravante denominada/abreviada como *O*-GlcNAc.

A ligação do açúcar simples *N*-acetil-glucosamina a resíduos de Serina (Ser) e Treonina (Thr), via ligação com a hidroxila da cadeia lateral destes aminoácidos, é controlada diretamente pela atividade de duas enzimas altamente conservadas, *O*-GlcNAc transferase (OGT; uridina difosfo-*N*-acetil glucosamina; polipeptídeo β -*N*-acetilglucosaminil transferase ou UDP-NAc transferase) e β -*N*-acetilglucosaminidase (OGA ou *O*-GlcNAcase) (ZACHARA; HART, 2006; HART; HOUSLEY; SLAWSON, 2007; ZACHARA; VOSSELLER; HART, 2012).

A enzima OGT possui em seu sítio catalítico um domínio capaz de se ligar com a uridina 5'-difosfato-*N*-acetilglucosamina (UDP-GlcNAc). Desta forma, a OGT é responsável por catalisar a adição de GlcNAc no grupamento hidroxil de resíduos de Ser/Thr, levando a formação de proteínas glicosiladas por *O*-GlcNAc. A OGT é encontrada no citoplasma, mitocôndrias e, preferencialmente, no núcleo e sua atividade é

controlada pela concentração de UDP-GlcNAc, produto final da via de biossíntese das hexosaminas (VBH) (NGOH et al., 2010).

A VBH (Figura 1) utiliza uma pequena fração (menos que 5 %) do total de glicose metabolizada e uma maior disponibilidade favorece o fluxo para esta via. A VBH apresenta os primeiros dois passos em comum com a via glicolítica: primeiro a hexoquinase produz glicose-6-fosfato pela fosforilação da glicose; em seguida, glicose-6-fosfato é convertida em frutose-6-fosfato. Após, a via diverge e a frutose-6-fosfato, na VBH, é convertida em glucosamina-6-fosfato, pela enzima glutamina:frutose-6-fosfato amidotransferase (GFAT), utilizando glutamina como doador do grupamento amino. A GFAT é considerada a enzima/etapa limitante desta via. A glucosamina-6-fosfato é convertida a *N*-acetil-glucosamina-6-fosfato, que por sua vez, culmina na formação de UDP-GlcNAc, substrato para enzima OGT nas modificações pós-traducionais (MPTs) de proteínas por *O*-GlcNAc (HANOVER; KRAUSE; LOVE, 2010; NGOH et al., 2010; LIMA et al., 2011b).

Por outro lado, a OGA está envolvida com a remoção hidrolítica de *O*-GlcNAc das proteínas que sofreram MPTs por *O*-GlcNAc (LIMA et al., 2009b). OGA possui distribuição tecidual semelhante a OGT, mas ao contrário da OGT, está localizada principalmente no citoplasma. A inibição da enzima OGA representa uma ferramenta útil no estudo dos efeitos de *O*-GlcNAc, promovendo aumento de proteínas *O*-GlcNAc (NGOH et al., 2010).

Figura 1. Via de biossíntese das hexosaminas. Enzimas envolvidas na formação de UDP-GlcNAc, a partir de glicose, glutamina ou glucosamina, culminando na formação de proteínas glicosiladas com *O*-GlcNAc. GFAT – glutamina:frutose-6-fosfato amidotransferase. OGT – *O*-GlcNAc transferase. OGA – *O*-GlcNAcase. Thiamet-G e PugNAc – inibidores da OGA. Adaptado de Lima *et al.* Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol (2011) e Hanover *et al.* Biochim Biophys Acta (2010).

Os níveis de proteínas modificadas por *O*-GlcNAc podem ser manipulados de diversas formas: pela hiperexpressão ou supressão da expressão de OGT, OGA e GFAT (enzima limitante da VBH que culmina com a formação do substrato para a OGT, UDP-GlcNAc); pela inibição farmacológica destas enzimas, por exemplo com Thiamet-G ou PugNAc (inibidores da OGA); ou, ainda, através do tratamento com glucosamina (GlcN) e glicose, substratos da VBH, aumentando os níveis globais de proteínas *O*-GlcNAc (MACAULEY *et al.*, 2005; MASSON *et al.*, 2005).

Praticamente todas as classes de proteínas citoplasmáticas e nucleares, incluindo enzimas (quinases, fosfatases), proteínas do citoesqueleto, fatores de transcrição, entre outras, são alvos de *O*-GlcNAc. Evidências preliminares sugerem que níveis elevados de *O*-GlcNAc estão associados ao aumento da proliferação celular, comprometimento da função endotelial, inflamação, fibrose - alterações características da disfunção vascular-, além de modular a atividade e localização de proteínas (LACZY et al., 2008; LIMA et al., 2009b).

Sepse e Resposta Inflamatória

Na definição do Instituto Latino Americano da Seps (ILAS) a seps é um conjunto de manifestações graves em todo o organismo produzidas por uma infecção e representa uma condição de risco de vida, sendo a principal causa de morte por infecção em todo o mundo (ILAS, 2017).

A seps foi descrita, primeiramente, pelo filósofo islamita Avicenna, como putrefação do sangue e tecidos acompanhada de febre (HOTCHKISS et al., 2016) e sua definição está sempre em atualização. Na conferência realizada pelo *American College of Chest Physicians* (ACCP) na *Society of Critical Care Medicine* (SCCM) em 1991 ficou estabelecido que a seps é uma síndrome de resposta inflamatória sistêmica (SIRS) que pode ocorrer em pacientes com infecção, sendo caracterizada por dois ou mais critérios de SIRS, dentre eles, taquipneia, taquicardia, hipertermia ou hipotermia, leucocitose ou leucopenia e número de neutrófilos imaturos no sangue maior que 10 % do total de leucócitos (BONE; SIBBALD; SPRUNG, 1992).

Os conceitos e critérios adotados na primeira conferência foram largamente utilizados. Contudo, importantes avanços na compreensão da fisiopatologia da seps foram obtidos nos últimos anos. Em 2016, a SCCM e a *European Society of Intensive*

Care Medicine (ESICM) publicaram novas definições, que incluíram mudança conceitual, e a sepse passou a ser definida como uma disfunção orgânica potencialmente fatal causada por uma resposta desregulada do hospedeiro à infecção. Para a identificação da disfunção orgânica, recomendou-se a utilização da pontuação obtida durante a avaliação da falência orgânica sequencial (SOFA, do inglês *Sequential Organ Failure Assessment*). O quadro de avaliação SOFA contém diferentes pontuações para as alterações nos sistemas respiratório, hepático, renal, cardiovascular e sistema nervoso central, além de modificações na coagulação sanguínea. Pelos novos critérios, definiu-se como disfunção orgânica o aumento em 2 pontos no escore basal, em consequência da infecção (SINGER et al., 2016).

Também houve modificação na definição de choque séptico, agora definido como sepse associada às anormalidades circulatórias e metabólicas (SINGER et al., 2016). Clinicamente, os pacientes com choque séptico requerem terapia vasopressora para manter a pressão arterial média acima de 65 mmHg associada a nível sérico de lactato superior a 2 mmol/L, após adequada ressuscitação volêmica (SHANKAR-HARI et al., 2016).

Apesar da evidente importância clínica da sepse, existe uma carência de dados epidemiológicos abrangentes sobre a mesma. Uma estimativa global recente, realizada através da metanálise de 27 estudos epidemiológicos de sete países desenvolvidos, sugere a incidência de 31,5 milhões de casos de sepse, com 5,3 milhões de óbitos, a cada ano. Esse estudo nos permite, ainda, observar que a incidência da sepse nesses países aumentou, substancialmente, com o passar dos anos, acompanhada de pequena redução da mortalidade (FLEISCHMANN et al., 2016). Como exemplo, nos Estados Unidos, a incidência passou de 359 para 535 casos de sepse a cada 100.000 habitantes, com a redução da mortalidade de 24 para 19 %, de 2003 para 2009 (WALKEY; LAGU;

LINDENAUER, 2015). Mesmo que a redução do percentual de morte entre os casos de sepse reflita a melhora no seu diagnóstico e tratamento, o grande aumento de sua incidência gera um preocupante aumento da mortalidade global.

Estudos de Fleischmann (FLEISCHMANN et al., 2016) geraram uma estimativa mundial, porém, a extrapolação da mesma aos países em desenvolvimento não é adequada, pois nessas regiões, os dados epidemiológicos são escassos e não permitem uma análise populacional. No Brasil, o estudo mais abrangente, referente às admissões em 5 unidades de terapia intensiva (UTIs) em 2001, identificou sepse em aproximadamente 61 % dos pacientes, com taxa de mortalidade de 34,7 %. Os dados revelam, ainda, que a mortalidade aumenta para 52,2 % quando ocorre evolução para o choque séptico (SILVA et al., 2004). A análise retrospectiva dos registros de óbito no Brasil sugere que o número de mortes por sepse aumentou de 96 para 187 a cada 100.000 habitantes, de 2002 para 2010 (TANIGUCHI et al., 2014). O custo médio estimado para a hospitalização de cada paciente com sepse no Brasil, em 2014, foi de R\$ 38,867.60; além disso, 59 % dos gastos totais são investidos em pacientes que progridem para a morte (BARRETO et al., 2016). Fatores relacionados à heterogeneidade individual também acrescentam complexidade à sepse, como idade, comorbidades, lesões, uso de medicamentos e foco primário da infecção (SINGER et al., 2016).

A falta de assinatura diagnóstica e os dados epidemiológicos são razões suficientes para elegermos a sepse como um dos maiores desafios para a ciência. Apesar dos avanços alcançados, devido às complexas interações dos sistemas em um organismo com sepse, muitos mecanismos permanecem desconhecidos.

A sepse é inicialmente uma doença inflamatória mediada pela ativação do sistema imune inato (HOTCHKISS et al., 2016) e compreende as funções de reconhecimento ou de sensibilização, assim como uma função efetora (SALOMÃO; BRUNIALTI;

MARTINS, 2007). Os eventos iniciais na sepse consistem no recrutamento de células de defesa, como leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos), monócitos/macrófagos, capazes de fagocitar e digerir patógenos, secretar citocinas e quimiocinas, as quais são responsáveis pela maioria das alterações fisiopatológicas observadas tanto em pacientes como em modelos experimentais de sepse (DINARELLO, 1997). Na sepse ocorre ativação de receptores de reconhecimento padrão, como os receptores do tipo *toll-like* (TLR) e o CD14, que reconhecem os patógenos ou seus produtos, identificados como padrões moleculares associados a patógenos (PAMP, do inglês *pathogen-associated molecular patterns*). Entre os exemplos de PAMP estão as endotoxinas das bactérias gram-negativas, as lipoproteínas e os peptidoglicanos (HOTCHKISS et al., 2016).

O lipopolissacarídeo (LPS), presente na parede de bactérias gram-negativas, é uma importante ferramenta no estudo da sepse, visto que, isoladamente, desencadeia no hospedeiro suscetível muitas das alterações observadas no decorrer da doença (SALOMÃO; BRUNIALTI; MARTINS, 2007). Para que os efeitos biológicos sejam desencadeados, o LPS deve se ligar à superfície celular por meio do CD14, seu principal receptor. Após a ligação do LPS ao CD14, forma-se um complexo, que desencadeia a ativação celular. O sinal de ativação é realizado por meio de um receptor transmembrana, o receptor *toll-like 4* (TLR-4), o qual se encontra associado ao CD14. Além de TLR-4 e CD14, ocorre associação de TLR-4 à molécula acessória MD-2, possibilitando uma maior sensibilidade ao LPS. O complexo TLR-4/MD-2 desencadeia a mobilização de proteínas citoplasmáticas, como a proteína adaptadora denominada Fator 88 de diferenciação mieloide (MyD88). A MyD88 por sua vez recruta a proteína quinase 4 associada ao receptor de interleucina-1 (IRAK4) que fosforila a quinase 1 associada ao receptor de interleucina-1 (IRAK1) para propagar o sinal pró-inflamatório, levando à fosforilação de um complexo específico de quinases (IKK) que fosforilam a proteína inibitória kappa B

(IKB) e levam a ativação das proteínas quinase ativadas por mitógenos (MAPKs), incluindo quinases p38 e c-Jun N-terminal (JNK), levando a uma cascata de ativação do citoplasma para o núcleo da célula até a translocação nuclear do fator nuclear kappa B (NF- κ B), que culmina na produção de diversas citocinas (COHEN, 2002; AO et al., 2007).

A secreção de citocinas pelas células inflamatórias residentes, principalmente neutrófilos e macrófagos, induzida pela ativação dos receptores de reconhecimento padrão, tem papel importante na estimulação da síntese de moléculas de adesão na superfície de células endoteliais colaborando, desta forma, para o recrutamento de outras células para o local da inflamação. Dentre os principais mediadores pró-inflamatórios na sepse, destacam-se o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), a interleucina-1 beta (IL-1 β) e a interleucina-6 (IL-6) (DINARELLO, 1997; AO et al., 2007).

Durante o processo inflamatório, a migração de monócitos para o sítio de infecção aumenta drasticamente, e o número de macrófagos começa a aumentar em poucas horas (h), podendo permanecer elevado até a resolução da inflamação. Os macrófagos exercem três funções principais: fagocitose e destruição de microrganismos, apresentação de antígenos e imunomodulação através da produção de várias citocinas e fatores de crescimento. Os macrófagos inflamatórios diferem dos macrófagos residentes especialmente pelo aumento da capacidade fagocítica e pela habilidade aumentada de gerar metabólitos tóxicos (FUJIWARA; KOBAYASHI, 2005). As citocinas e produtos microbianos afetam diferentemente a função dos macrófagos ativando ou desativando-os (MANTOVANI et al., 2004).

Sendo os macrófagos uma das primeiras linhas de defesa do organismo contra vários patógenos, estas células são capazes de se distribuir pelos tecidos e podem fenotipicamente se diferenciar em duas principais subpopulações: macrófagos M1 (ou

ativados classicamente) e macrófagos M2 (*tipo II* ou *ativados alternativamente*), os quais possuem funções diferentes durante a resposta imunológica (MANTOVANI et al., 2004). Os macrófagos M1 e M2 diferem entre si em relação aos receptores que expressam, à sua função efetora e a produção de citocinas, uma característica fundamental na polarização dos macrófagos.

O fenótipo M1 ocorre em resposta a produtos microbianos, como LPS ou interferon-gama (IFN- γ), e produz tipicamente altas concentrações de interleucina-12 e IL-23 e baixas concentrações de IL-10, enquanto macrófagos M2 secretam altas concentrações de IL-10 e baixas de IL-12 (VERRECK et al., 2004). A ativação de macrófagos M1 é caracterizada por altos níveis da isoforma induzível da óxido nítrico sintase (iNOS), resultando na produção de óxido nítrico (NO) e seus intermediários e também de espécies reativas de oxigênio (EROs). Assim, os macrófagos M1 podem servir como potentes células efetoras que combatem microrganismos e células tumorais, apresentam antígenos e produzem grandes quantidades de citocinas pró-inflamatórias (GORDON; TAYLOR, 2005).

A exposição a hormônios glicocorticóides e interleucinas, como IL-4, IL-10 e IL-13, promove polarização de macrófagos para o fenótipo M2, descrito pela primeira vez pelo grupo de Simon Gordon (GORDON; TAYLOR, 2005). Células M2 são geralmente caracterizadas pela baixa produção de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , TNF- α e IL-6 (MANTOVANI et al., 2004).

Os dois fenótipos de ativação dos macrófagos (M1 e M2) não são eventos pontuais, mas sim um contínuo estado funcional destas células que se modificam durante as fases do processo inflamatório, havendo o predomínio de um tipo de macrófago sobre o outro de acordo com a fase do processo, sendo essa transição determinada pelas citocinas predominantes no microambiente (BISWAS; MANTOVANI, 2010). Assim, a

persistência de determinado perfil de citocinas e quimiocinas poderá contribuir para o desenvolvimento de um estado inflamatório infeccioso crônico em que prevalecerá um subtipo de macrófagos.

Relatos recentes da literatura enfatizam que tanto o número de macrófagos infiltrados, como também o tipo de ativação são importantes para a manutenção e/ou resolução do estado de inflamação. Identificação de mecanismos e moléculas capazes de modificar o equilíbrio entre M1 e M2 representa um campo de pesquisa importante.

Como discutiremos adiante, é possível que *O*-GlcNAc module respostas inflamatórias e/ou imunes por modificar o equilíbrio entre macrófagos M1/M2. A investigação de fatores que modulam a expressão e função de diferentes tipos de macrófagos, bem como sua contribuição na fisiopatologia de doenças cardiovasculares e metabólicas, é de fundamental importância no estudo de moléculas que controlam o equilíbrio de macrófagos M1/M2, podendo desvendar possíveis aplicações terapêuticas.

Além das células do sistema imune, as células endoteliais tem participação importante no desencadeamento de fenômenos inflamatórios existentes na sepse. O endotélio perde suas principais funções: a) de barreira – passando a permitir maior passagem de células e de fluidos para o espaço extravascular e os pacientes têm como manifestação clínica o edema em pulmões, rins e cérebro; b) de controle do tônus vascular – ocorrendo aumento da produção de NO pela ativação de genes que codificam a produção da enzima sintase do óxido nítrico (NOS), induzindo aumento da vasodilatação e consequente queda da resistência arterial sistêmica, característica das fases iniciais de sepse; e c) de manutenção do equilíbrio entre propriedades anticoagulantes e pró-coagulantes – durante a sepse ocorre mudanças na expressão de fatores envolvidos na coagulação, como produção do ativador do plasminogênio tecidual e inibidor 1, aumento da expressão de moléculas de adesão [E-selectina, P-selectina e molécula de adesão

intercelular I (ICAM-1)], levando à oclusão de microvasos, perda do número de capilares perfundidos e consequente hipóxia tecidual e disfunção orgânica (TANIGUCHI; ISSA, 2007).

O sistema cardiovascular é um dos mais afetados pela resposta que ocorre na sepse grave e no choque séptico. É sabido, desde a década de 80, que na sepse ocorre depressão da função miocárdica, mesmo nos pacientes com débito cardíaco elevado, com recuperação em 7 a 10 dias nos indivíduos que sobrevivem. Essa disfunção miocárdica é consequência de múltiplas alterações celulares, como o efeito das citocinas, NO, lisozimas 6 e C, DNA e RNA bacterianos (HENKIN et al., 2009). Desta forma, se a homeostase do sistema não puder ser mantida, os diversos órgãos e sistemas começam a apresentar progressiva disfunção, caracterizando a síndrome de disfunção de múltiplos órgãos, dentre eles, citamos os distúrbios cardiovasculares que são de grande importância neste nosso estudo.

O-GlcNAc, Sistema Cardiovascular e o Processo Inflamatório

O sistema cardiovascular é essencial para o transporte de hormônios, oxigênio e nutrientes para os tecidos e também na remoção dos produtos do metabolismo celular. A distribuição do sangue para os tecidos é altamente regulada por mecanismos que controlam o tônus vascular, os quais promovem contração ou relaxamento das células de músculo liso vascular (CMLV). A disfunção vascular, que é causada em parte por alterações na função das CMLV, está associada a diversas doenças, como diabetes, hipertensão arterial, sepse, entre outras (SAFAR; BOUDIER, 2005)

A regulação do tônus vascular ocorre por uma variedade de fatores, tais como: neurotransmissores, hormônios, fatores derivados do endotélio - como os fatores de contração [prostaglandina, endotelina-1 (ET-1)] e fatores de relaxamento (NO,

prostaciclina), fatores derivados de células sanguíneas - como serotonina, histamina e citocinas, fatores derivados do tecido adiposo perivascular (PVAT) - como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), fatores locais - como os metabólitos dióxido de carbono (CO_2) e íons hidrogênio (H^+), bem como pelos componentes intrínsecos das CMLV (SEKO et al., 2003; NUNES; RIGSBY; WEBB, 2010).

Nos últimos anos, novas descobertas relacionadas a *O*-GlcNAc indicam que esta MPT tem importante função no sistema cardiovascular. Estudos recentes sugerem que proteínas importantes na função cardiovascular são alvos da *O*-GlcNAc (WRIGHT et al., 2017). É importante ressaltar que os estudos sobre o *O*-GlcNAc no sistema vascular estão em fase inicial. Consequentemente, muito deve ser explorado para descobrirmos a função da *O*-GlcNAc no sistema vascular e seu papel na disfunção vascular associada a doenças cardiovasculares e metabólicas.

No sistema vascular, OGA, bem como OGT, são expressas tanto em células endoteliais quanto CMLV e alterações da expressão vascular destas enzimas tem sido relatadas na hiperglicemia/diabetes, envelhecimento e hipertensão arterial (LIMA et al., 2012).

Estudo de Yang e colaboradores descreveram um mecanismo molecular pelo qual estímulos nutricionais podem regular a sinalização da insulina através de *O*-GlcNAc, contribuindo para a etiologia da resistência à insulina e diabetes tipo 2. Neste trabalho, foi demonstrado em adipócitos 3T3 que, após estímulo com insulina, o fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3) recruta a OGT a partir do núcleo para o citosol, formando um tipo de ligação, antes não reconhecido, OGT-PIP3. Esta ligação impede espacialmente a ligação PIP3-Akt, bloqueando a via de sinalização da insulina (YANG et al., 2008). Trabalho de McClain e colaboradores demonstraram que a superexpressão da OGT no

tecido adiposo e musculatura esquelética de camundongos induz resistência à insulina e hiperleptinemia, resultado de desregulação da VBH (MCCLAIN et al., 2002).

Estudos em nosso grupo, por Lima e colaboradores, demonstraram que o tratamento com inibidor seletivo da OGA (PugNAc 100 μ M, por 24 h) aumenta o conteúdo global de proteínas *O*-GlcNAc, bem como promove aumento da resposta vascular a estímulos contráteis como fenilefrina (PE) e serotonina (LIMA et al., 2008). Em ratos hipertensos DOCA-sal, onde também ocorre aumento de reatividade vascular, foi encontrado aumento do conteúdo vascular de proteínas *O*-GlcNAc, tanto em artérias de resistência do leito mesentérico quanto em aorta (leito de condutância) (LIMA et al., 2009a). Usando CMLV em cultura, foi observado que a *O*-GlcNAc contribui para os efeitos vasculares da ET-1 via ativação do sistema RhoA/Rho-quinase. CMLV estimuladas com ET-1 exibem aumento tempo-dependente da expressão da forma fosforilada da subunidade 1 da miosina fosfatase (MYPT-1, alvo da Rho-quinase), de CPI-17, que inibe a enzima miosina fosfatase, e da cadeia leve de miosina (MLC₂₀), assim como da expressão e atividade de RhoA, e estes efeitos são mediados por aumento dos níveis de *O*-GlcNAc (Lima et al., 2011).

Em concordância, Kim e colaboradores observaram que glucosamina, a qual induz aumento de proteínas *O*-GlcNAc, aumenta a contração vascular estimulada com U46619, agonista tromboxano A₂, pelo aumento da fosforilação da MYPT-1 (Tre⁸⁵⁵), CPI-17, MLC₂₀ e atividade de RhoA. Os efeitos da glucosamina foram bloqueados pela inibição da OGT (KIM et al., 2011). Esses estudos indicam que o tratamento crônico com *O*-GlcNAc interfere com processos vasculares, principalmente na reatividade vascular, e que *O*-GlcNAc talvez tenha participação direta na disfunção vascular associada a diferentes doenças onde se observa hiper-reatividade vascular.

Por outro lado, já foi demonstrado que após injúria vascular, causada por colocação de cateter balão em artéria carótida comum de ratas ovariectomizadas, o tratamento com GlcN ou PugNAc aumenta os níveis de proteínas modificadas por *O*-GlcNAc e inibe as respostas inflamatórias e aumento da camada neoíntima nesses vasos (XING et al., 2008). Nesse trabalho foi sugerido que o aumento das proteínas modificadas pela *O*-GlcNAc em vasos sanguíneos poderia representar um novo mecanismo anti-inflamatório e vasoprotetor. Neste sentido, foi demonstrado que GlcN, um metabólito precursor de UDP-GlcNAc, aumenta os níveis de proteínas modificadas por *O*-GlcNAc e aumenta a motilidade de neutrófilos, células diretamente envolvidas no processo inflamatório (KNEASS; MARCHASE, 2004).

Os efeitos agudos produzidos pelo aumento transitório da produção de *O*-GlcNAc estão associados também à melhora na função cardíaca. *O*-GlcNAc aumenta a sobrevivência de células cardíacas, após condições de estresse agudo como isquemia-reperfusão e trauma hemorrágico, enquanto a inibição da produção de *O*-GlcNAc diminui a sobrevivência destas células. Além disso, o tratamento com GlcN reduz os níveis de citocinas pró-inflamatórias circulantes, tais como TNF- α e IL-6 (YANG et al., 2006) e atenua a ativação do NF- κ B induzida por LPS em linhagem de macrófagos RAW264.7 (ZOU et al., 2009).

A melhora da função cardíaca observada após o trauma-hemorrágico frente ao tratamento com GlcN pode ser explicada, em parte, pela atenuação da ativação do NF- κ B, mediada pelo aumento dos níveis de proteínas *O*-GlcNAc. O NF- κ B exerce papel central na regulação e liberação de diversas citocinas e enzimas pró-inflamatórias, incluindo TNF- α , IL-6, IL-1 β , iNOS, dentre outras (LIANG; ZHOU; SHEN, 2004; ZOU et al., 2009).

O processo inflamatório desempenha papel importante não somente na sepse, mas também na patogênese de diversas doenças vasculares. A liberação e expressão de mediadores inflamatórios aumenta marcadamente em doenças cardiovasculares e contribui para as lesões de órgãos-alvo nestas condições (LACZY et al., 2009; XING et al., 2011).

Neste contexto, a glicosilação de proteínas por *O*-GlcNAc tem sido descrita como um importante mecanismo regulatório que modifica as respostas ao estresse no sistema cardiovascular (XING et al., 2011). Além dos exemplos citados acima, foi descrito que o aumento nos níveis de *O*-GlcNAc com GlcN diminui a expressão de mediadores pró-inflamatórios, como IL-6 e ciclooxygenase-2 (COX-2) em condrócitos humanos; inibe a bioatividade de IL-1 β em condrócitos de ratos; regula negativamente a expressão de ICAM-1 induzida por TNF- α ; suprime funções de neutrófilos como a geração de ânion superóxido (O₂^{•-}); reduz os níveis circulantes de IL-6 e TNF- α no coração, fígado e rim de ratos submetidos a hemorragia por trauma (NÖT et al., 2007; ZOU et al., 2007, 2009; XING et al., 2008). O aumento dos níveis de proteínas glicosiladas, pelo tratamento com GlcN, também inibe a fosforilação da subunidade p65, crucial para ativação do NF- κ B e para a expressão de vários genes envolvidos na inflamação vascular como, por exemplo, quimiocinas, moléculas de adesão e iNOS (XING et al., 2011).

Frente a estes estudos indicando efeitos importantes de *O*-GlcNAc em processos inflamatórios, estudos adicionais sobre os efeitos das modificações por *O*-GlcNAc em situações patológicas são essenciais para o esclarecimento do papel desta modificação pós-traducional na evolução da sepse, na compreensão dos mecanismos da doença e na possível indicação de novas intervenções farmacológicas.

Hipótese

2 HIPÓTESE

Considerando que:

- ✓ A modificação pós-traducional por *O*-GlcNAc é considerada um mecanismo adicional de controle da sinalização intracelular;
- ✓ *O*-GlcNAc modula a liberação de mediadores inflamatórios, a reatividade vascular e a função cardíaca;
- ✓ A sepse é uma resposta inflamatória sistêmica frente à infecção, denotando um processo progressivo de injúria tecidual, levando a disfunção múltipla de órgãos, incluindo aqueles do sistema cardiovascular.

Formulamos a seguinte hipótese de trabalho:

O aumento agudo da modificação por *O*-GlcNAc reduz os níveis sistêmicos de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , IL-6 e TNF- α , bem como a ativação do fator de transcrição NF- κ B, reduzindo o processo inflamatório e disfunção vascular em animais com endotoxemia.

Esquema 1. Esquema ilustrativo da hipótese de trabalho

Objetivos

3 OBJETIVOS

O objetivo principal deste estudo é avaliar os efeitos do aumento agudo de proteínas modificadas por *O*-GlcNAc na liberação de mediadores inflamatórios, na disfunção vascular e hipotensão arterial, bem como na mortalidade e lesões de órgãos-alvo em animais com endotoxemia induzida por LPS.

Pretendemos com este estudo entender como a *O*-GlcNAc modula sinais intracelulares que determinam como uma célula responde a estímulos extracelulares associados a inflamação e sepse.

3.1 Objetivos específicos

Os objetivos específicos deste estudo incluíram:

3.1.1 Padronizar o tratamento *in vivo* com Glucosamina e Thiamet-G para promover aumento de proteínas modificadas por *O*-GlcNAc;

3.1.2 Avaliar se o aumento de proteínas glicosiladas atenua a resposta inflamatória e, conseqüentemente, aumenta a sobrevida de animais submetidos a endotoxemia por LPS;

3.1.3 Determinar se *O*-GlcNAc atenua a refratariedade vascular e a hipotensão arterial observadas no modelo de endotoxemia por LPS;

3.1.4 Avaliar as vias de sinalização envolvidas nos efeitos do aumento de proteínas *O*-GlcNAc na endotoxemia por LPS e em macrófagos.

Materiais e Métodos

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Cultura de macrófagos – *in vitro*

4.1.1 Animais

Este estudo está em conformidade com os princípios éticos na experimentação animal adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo (protocolo n° 019/2013).

Foram utilizados camundongos Balb/c ou C57BL6/J machos de 8 a 10 semanas de idade, provenientes do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Os camundongos foram alocados no Biotério de manutenção do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP e mantidos em sala com temperatura controlada (22 ± 2 °C), ciclos claro/escuro de 12 h, 60 % de umidade, e alimentados com ração padrão e água *ad libitum*.

4.1.2 Preparo e diferenciação dos macrófagos derivados da medula óssea

Os macrófagos foram isolados a partir da medula óssea do fêmur de camundongos Balb/c (nos protocolos de diferenciação de macrófagos) ou C57BL6/J (para os demais protocolos deste trabalho). Após dissecação do fêmur, a medula óssea foi retirada e a suspensão celular centrifugada a 2000 rpm a 4 °C por 10 minutos (min). O *pellet* formado foi ressuspensionado em meio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich), contendo 30 % de meio condicionado de células L929 (LCCM: L929 - *cell conditioned medium*), 20 % de soro fetal bovino (SFB, Gibco), 1 % de antibiótico (Penicilina/Streptomicina, Gibco), 0,12 %

fungicida (Fungizone, Gibco) e 2 mM de L-glutamina (Sigma-Aldrich). As células foram colocadas em placas de cultivo e incubadas em estufa de CO₂ (5 %), a 37 °C por sete dias.

Após sete dias de incubação, os macrófagos foram coletados com tampão salina-fosfato (PBS) gelado, contados em câmara de Neubauer e plaqueados em meio RPMI-1640 contendo 10 % de SFB. Os estímulos foram realizados de acordo com cada protocolo experimental descrito abaixo. Para o protocolo de diferenciação dos macrófagos em M1 e M2, após coletar, contar e plaquear os macrófagos em placa de 24 poços, foram adicionados 5 ng/ml de fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF, R&D Systems) ao meio (KUROWSKA-STOLARSKA et al., 2008). Para a diferenciação dos macrófagos em M1 e M2 foram adicionados ao meio os estímulos necessários para diferenciação celular: LPS 1 µg/ml e interferon-gama (IFN-γ, R&D Systems) 200 ng/ml para macrófagos M1 e interleucina 4 (IL-4, R&D Systems) 50 ng/ml para macrófagos M2. Os macrófagos que não foram estimulados com citocinas foram denominados de macrófagos M0 ou foram utilizados em outros experimentos, descritos posteriormente.

4.1.3 Ferramenta farmacológica para aumento das proteínas glicosiladas por O-GlcNAc em macrófagos

Macrófagos foram estimulados com Thiamet-G - 1 µM (ThG, Cayman), glucosamina - 5 mM (GlcN, Sigma-Aldrich) ou veículo, por diferentes tempos (30 min, 1, 3, 6, 12, 24 e 48 h). Os níveis de proteínas modificadas por O-GlcNAc foram determinados por *western blot*.

4.1.4 Citometria de fluxo

No intuito de caracterizar a população de macrófagos, foram realizadas marcações específicas para cada subtipo de macrófago, M1 ou M2.

Suspensão de macrófagos (1×10^6 células/tubo) foi incubada com 100 μ L *Fc block*, bloqueador da porção Fc de imunoglobulinas (anticorpo proveniente de sobrenadante de hibridoma de anti-CD16/ CD32), para evitar ligações inespecíficas, por 20 min a 4 °C. Em seguida, as células foram marcadas com anticorpos monoclonais extracelulares F4/80 (eBioscience) para os macrófagos em geral, receptor do tipo *toll* 2 (TLR-2) ou iNOS (eBioscience) para macrófagos M1, e receptor de manose (MR ou CD206, AbSerotec) para macrófagos M2, por 30 min a 4 °C.

Após a incubação, as amostras foram lavadas duas vezes com 2 ml de PBS contendo 2 % de SFB, centrifugadas a 400 g, a 4 °C, por 10 min e ressuspensas em 80 μ l de solução de formaldeído a 1 % em PBS. Após esses procedimentos, as amostras foram passadas no citômetro de fluxo FACScanto (BD Immunocytometry System, Franklin Lakes, NJ). As análises foram realizadas utilizando-se o programa FCS Express V3 (DE NOVO SOFTWARE), o qual permite analisar todas as células adquiridas (50000 eventos/*gate* de F4/80⁺/amostra), individualizadas por janelas (*gates*).

Ao realizar a análise dos macrófagos, foi traçada uma janela nos *singlet* (células únicas), baseando-se nos parâmetros de tamanho em altura (FSC- *forward side scatter - height*) e tamanho em área (FSC- *forward side scatter - area*) para excluir os *doublets* (células agrupadas). Em seguida, as células da região R1 foram distribuídas segundo os parâmetros de complexidade (SSC- *side light scatter*) e tamanho (FSC- *forward side scatter*) e traçado uma janela específica para os macrófagos (R2), baseando-se na população celular. Finalmente, as células delimitadas pelas regiões R1 e R2 foram somadas e distribuídas num parâmetro de TLR-2⁺ ou iNOS⁺ por MR⁺. A população

presente no quadrante direito inferior foi considerada macrófagos M1, enquanto no quadrante esquerdo superior foi considerada macrófagos M2.

4.2 Modelo Experimental - *in vivo*

4.2.1 Animais

Para a indução de endotoxemia por LPS e sepse por ligação e perfuração do ceco (CLP) foram utilizados camundongos C57BL6/J machos, de 8 a 10 semanas de idade, mantidos sob as mesmas condições descritas anteriormente no item 4.1.1 e em conformidade com os princípios éticos adotados pelo CONCEA. Os protocolos foram aprovados pelo CEUA da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo (protocolo n° 196/2013).

4.2.2 Ferramentas farmacológicas para aumento dos níveis de proteínas glicosiladas *in vivo*

Glucosamina (300 mg/Kg; i.v.; 30 min antes da administração de LPS ou 1 h após indução CLP) e Thiamet-G (150 µg/Kg; i.v.; 12 h antes da administração de LPS) foram utilizados como ferramentas farmacológicas para aumento dos níveis de proteínas glicosiladas nos animais C57BL6/J.

Os animais foram tratados com esses fármacos ou veículo (solução salina i.v.). A escolha da dosagem e o tempo de tratamento foram determinados em experimentos pilotos através da medida dos níveis de proteínas glicosiladas em artérias pela técnica de *western blot*, descrita posteriormente.

4.2.3 Modelo de endotoxemia por LPS

Após o tratamento com Glucosamina, Thiamet-G ou veículo, foi realizada a indução da endotoxemia através da utilização de lipopolissacarídeo (LPS, Sigma-Aldrich) para endotoxemia moderada (10 mg/Kg de animal, i.p.) e severa (20 mg/Kg de animal, i.p.). Seis horas após a indução da endotoxemia, os animais foram sacrificados e realizados os experimentos. Apesar de realizarmos a indução da endotoxemia através da aplicação do LPS em duas doses (moderada e severa), neste trabalho apresentaremos apenas os resultados obtidos com a endotoxemia severa, uma vez que os resultados obtidos nos dois grupos experimentais foram semelhantes e o tratamento com aumento de proteínas modificadas por *O*-GlcNAc foi capaz de induzir alterações mais evidentes com a maior dose de LPS (endotoxemia severa).

Os grupos experimentais foram assim divididos:

- **Controle Veículo (Cont):** grupo controle + veículo (salina);
- **Controle Tratado com GlcN (Cont + GlcN):** grupo controle + tratamento com glucosamina (300 mg/Kg, i.v.);
- **Controle Tratado com ThG (Cont + ThG):** grupo controle + tratamento com Thiamet-G (150 µg/Kg, i.v.);
- **Endotoxemia por LPS (LPS sev):** grupo submetido a endotoxemia severa (LPS sev) por injeção de LPS, conforme descrito acima;
- **Endotoxemia por LPS Tratado com GlcN (LPS sev + GlcN):** grupo tratado com glucosamina + endotoxemia severa (LPS sev) por LPS;
- **Endotoxemia por LPS Tratado com ThG (LPS sev + ThG):** grupo tratado com Thiamet-G + endotoxemia severa (LPS sev) por LPS.

4.2.4 Modelo de sepse – CLP

Como modelo de sepse foram utilizados camundongos submetidos a CLP, conforme proposto por Benjamim (FARIAS BENJAMIM et al., 2002) e modificado por Alves-Filho (ALVES-FILHO et al., 2010). Após celiotomia mediana com incisão de aproximadamente 1 cm, o ceco foi exposto e ligado com fio de algodão 4-0 na altura da válvula íleocecal. A extremidade do ceco foi transfixada a perfuração com agulha 18G, pressionando-se o órgão para saída de fezes. O ceco foi devolvido à cavidade peritoneal e submetido a sutura com fio de algodão 4-0. Todos os animais receberam injeção s.c. de 1 ml de solução de cloreto de sódio 0,9 % após a cirurgia e foram mantidos à 25 °C durante a recuperação da anestesia. Os animais sham (controles, falso operados) foram submetidos ao mesmo procedimento, porém sem as perfurações no ceco.

Os grupos experimentais foram assim divididos:

- **Sham (Sham):** grupo controle
- **Sham + hidratação + antibiótico (Sham + ATB):** grupo controle submetido a hidratação (1 ml de salina, s.c., aplicação única, após a cirurgia) + antibiótico (Ertapenem, 30 mg/kg, s.c. – 1 h após a cirurgia e de 12/12 h por 3 dias).
- **Sham + hidratação + antibiótico + Glucosamina (Sham + ATB + GlcN):** grupo controle submetido a hidratação (1 ml de salina, s.c., aplicação única, após a cirurgia) + antibiótico (Ertapenem, 30 mg/kg, s.c. – 1 h após a cirurgia e de 12/12 h por 3 dias) + Glucosamina (300 mg/kg de animal, i.v.).
- **CLP (CLP):** grupo submetido a perfuração do ceco com agulha 18G
- **CLP + hidratação + antibiótico (CLP + ATB):** grupo submetido a perfuração do ceco com agulha 18G + hidratação (1 ml de salina, s.c., aplicação única, após a cirurgia) + antibiótico (Ertapenem, 30 mg/kg, s.c. – 1 h após a cirurgia e de 12/12 h por 3 dias).

- **CLP + hidratação + antibiótico + Glucosamina (CLP + ATB + GlcN):** grupo submetido a perfuração do ceco com agulha 18G + hidratação (1 ml de salina, s.c., aplicação única, após a cirurgia) + antibiótico (Ertapenem, 30 mg/kg, s.c. – 1h após a cirurgia e de 12/12 h por 3 dias) + Glucosamina (300 mg/kg de animal, i.v.).

4.2.5 Curva de Sobrevida

Para análise da sobrevida, os animais dos grupos descritos acima foram monitorados duas vezes ao dia, após a indução da endotoxemia severa por LPS ou CLP, por um período de sete dias. Os resultados foram expressos em % de sobrevida.

4.2.6 Contagem total e diferencial de células

Após os camundongos serem sacrificados, a suspensão celular do lavado peritoneal foi coletada com 3 mL de PBS com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA, Merck) e a contagem total de células do lavado peritoneal foi realizada utilizando contador automático de células (Coulter[®]ACT; Coulter Corporation, Miami, Florida, USA).

As lâminas para contagem diferencial foram preparadas por citocentrifugação (cytospin; Shandon Lipshaw Inc, Pittsburgh, Pennsylvania, USA) de uma alíquota do lavado peritoneal (40 µl) e coradas com o corante panótico rápido (LaborClin; Produtos para Laboratório Ltda, Pinhais, PR, Brasil). As células foram examinadas em microscópio óptico através da objetiva de imersão em óleo (aumento de 1000 x), sendo contadas 100 células por lâmina, diferenciando-se quatro tipos celulares: neutrófilos, macrófagos, eosinófilos e mastócitos. A quantificação de neutrófilos foi calculada pela porcentagem dessas células contadas nos esfregaços e pela quantidade de células totais obtidas na

contagem total. Os resultados foram expressos como número de neutrófilos $\times 10^6$ presentes no lavado peritoneal.

4.2.7 Determinação da atividade da mieloperoxidase no pulmão

O infiltrado de neutrófilos para os pulmões dos animais dos grupos estudados foi avaliado indiretamente pelo ensaio enzimático da mieloperoxidase (MPO). A mieloperoxidase é encontrada predominantemente em neutrófilos, perfazendo o maior constituinte dos grânulos azurófilos citoplasmáticos. Os neutrófilos estão entre as primeiras células a migrarem para o foco inflamatório. Ao sofrerem degranulação, difundem para o meio extracelular mediadores como a mieloperoxidase que, por sua vez, é capaz de reagir com H_2O_2 e gerar EROs, as quais contribuem para a atividade microbicida bem como para danos teciduais. Desta forma, a medida da atividade da enzima MPO é utilizada com frequência como marcador indireto da migração de neutrófilos para o tecido lesado (DAVIES, 2011).

Resumidamente, os animais foram perfundidos com PBS, o lobo pulmonar direito coletado e imerso em 200 μ L de tampão potássio (20 mmol/l de K_2HPO_4 , pH 7,4, 4 °C). As amostras de tecido foram trituradas com auxílio de homogeneizador de tecidos (Polytron - PT3100) a 13000 rpm. Logo em seguida, as amostras foram centrifugadas a 2000 g a 4 °C por 15 min. Com o objetivo de romper as células, 200 μ L de tampão potássio [50 mmol/l, contendo 0,5 % (p/v) hidróxido hexadeciltrimetil-amônio] foram adicionados ao *pellet*. A atividade de MPO foi medida através da alteração da absorbância a 450 nm, utilizando solução de leitura (5 mg de o-dianisidina; 15 μ L de 1 % de H_2O_2 , 3 ml de tampão fosfato, 27 ml de H_2O). A atividade obtida foi comparada a uma curva padrão com neutrófilos purificados da cavidade peritoneal de camundongos, 6 h após a

administração de tioglicolato, via i.p. A atividade da MPO foi expressa como equivalente ao número de neutrófilos por mg de tecido.

4.2.8 Registro da Pressão Arterial Média

O registro da pressão arterial média (PAM) foi realizado através do procedimento cirúrgico da canulação da artéria carótida e veia jugular dos animais. A cânula acoplada à veia jugular foi utilizada para administração, no dia do experimento, das drogas utilizadas no modelo (Glucosamina e LPS). Após 3 dias do procedimento cirúrgico, a cânula da artéria carótida foi acoplada a um transdutor conectado a um amplificador, sendo este acoplado a um computador equipado com uma placa conversora analógico-digital (PowerLab/8SP, ADInstruments, Austrália). O programa *DMT Normalization Module* (ADInstruments, Austrália) foi utilizado para aquisição e análise dos dados experimentais.

4.2.9 Estudo de reatividade vascular em Aorta e Artérias Mesentéricas de Resistência

O método descrito por Mulvany e Halpern foi utilizado para os estudos de reatividade vascular (MULVANY; HALPERN, 1977). Os animais foram sacrificados e a aorta torácica e leito mesentérico removidos, retirando-se o excesso de tecido adiposo e conjuntivo. Os tecidos foram transferidos para uma solução fisiológica de *Krebs-Henseleit* a 4 °C (composição em mmol/L: NaCl 118.3, KCl 4.7, MgSO₄•7H₂O 1.2, KH₂PO₄ 1.2, CaCl₂•2H₂O 2.5, NaHCO₃ 25.0, EDTA 0.01 e glicose 11.1; pH de 7,4).

4.2.9.1 Artéria Aorta

Os segmentos de artéria aorta foram cortados em anéis de aproximadamente 2-3 mm. Para obtenção do registro de tensão isométrica, os anéis de aorta foram montados em cuba com duas hastes de aço inoxidável, onde um dos ganchos é conectado a um transdutor de sinal de tensão isométrica (ML T001 transdutor isométrico de tensão, Power Lab/8S, ADInstruments Pty Ltda, Austrália) acoplado a um computador. Os canais do miógrafo foram preenchidos com solução de *Krebs* gaseificada continuamente com mistura carbogênica contendo 95 % de oxigênio (O₂) e 5 % de dióxido de carbono (CO₂) e aquecidos a 37 °C. Após a montagem, os anéis aórticos foram submetidos a uma tensão de repouso de 10 mN (milinewton), regulada nos primeiros 30 min do experimento. Durante o período de estabilização, a solução fisiológica foi trocada a cada 10 min, objetivando-se, dessa forma, evitar o acúmulo de metabólitos, como também a restauração dos níveis de glicose necessários ao metabolismo vascular.

Após o período de estabilização dos segmentos vasculares em *Krebs*, as artérias foram contraídas pela administração de cloreto de potássio (KCl, 120 mmol/L), com a finalidade de se avaliar a integridade funcional. Após, a integridade do endotélio foi testada por meio da avaliação do relaxamento à acetilcolina (ACh), vasodilatador dependente do endotélio, em vasos pré-contraídos com fenilefrina (PE). A resposta vasoconstritora induzida pela PE foi expressa como força de contração em mN e a vasodilatação induzida pela ACh como porcentagem de relaxamento em relação à contração induzida por PE.

4.2.9.2 Ramos da Artéria Mesentérica

A reatividade em artérias de resistência foi determinada utilizando o segundo ramo da artéria mesentérica superior. O ramo foi dissecado e cortado em segmentos de 2,0 mm

de comprimento com o auxílio de uma lupa. Dois fios de tungstênio (25 µm de diâmetro) foram então inseridos no lúmen das artérias. Os anéis foram montados em um miógrafo para vasos de resistência (modelo 610M; Danish Myo Technology – DMT, Copenhagen, Denmark) para o estudo da tensão isométrica. O miógrafo conectado a um sistema para aquisição de dados (PowerLab8/8SP, ADInstruments, Austrália) acoplado a um computador. Os canais do miógrafo foram preenchidos com solução de *Krebs* gaseificada continuamente com mistura carbogênica contendo 95 % de O₂ e 5 % de CO₂ e aquecidos a 37 °C.

Normalização da tensão em artérias mesentéricas de resistência

O propósito do procedimento de normalização é distender o segmento vascular até que se atinja a chamada circunferência interna normalizada (IC1): definida como uma fração determinada da circunferência interna (IC100) que um segmento totalmente relaxado teria em uma determinada pressão transmural. Para artérias mesentéricas de resistência, a pressão transmural alvo é de 100 mmHg, que corresponde a 13,3 kPa.

Após o período de estabilização e aquecimento dos segmentos vasculares (15 min) em solução de Krebs-Henseleit (pH 7,4 e a 37 °C), as artérias mesentéricas foram distendidas de forma gradativa e os valores de leitura do micrômetro e da força aplicada foram registrados a cada ponto. Estes dados foram então convertidos em valores de circunferência interna (µm) e de tensão na parede vascular T (mN/mm), respectivamente. A plotagem da tensão na parede do vaso contra a circunferência interna revela uma curva exponencial. Pela aplicação da curva de isobarra correspondente a 100 mmHg, a IC100 é então calculada a partir do ponto de interseção, utilizando o software específico para normalização de artérias de resistência (DMT Normalization Module, ADInstruments, Austrália). A IC1 foi calculada a partir da IC100 por meio da fórmula $IC1 = 0,90 \times IC100$,

dando uma circunferência interna na qual a produção de força ativa bem como a sensibilidade do segmento a agonistas é máxima. O diâmetro interno normalizado será calculado dividindo-se IC1 por π .

Após o procedimento descrito acima, foram realizados os testes de viabilidade vascular e endotelial e, posteriormente, foram realizadas as curvas concentração-resposta para PE e ACh, em preparações dos animais dos grupos experimentais do modelo de endotoxemia por LPS descritos anteriormente.

4.3 Protocolos moleculares

4.3.1 Avaliação da viabilidade celular

A viabilidade celular frente a todos os compostos utilizados foi avaliada pelo método da quantificação da redução do 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5 brometo de difenil tetrazólio (MTT, Sigma-Aldrich). O ensaio de MTT baseia-se na medida do dano induzido pelo composto em estudo no metabolismo celular através da avaliação da atividade de desidrogenases mitocondriais. A viabilidade mitocondrial, e consequentemente, a viabilidade celular, é quantificada pela redução do MTT (um sal de coloração amarela e solúvel em água) a formazan (sal de coloração arroxeada e insolúvel em água) pela atividade daquelas enzimas. Dessa forma, a redução do MTT a formazan é diretamente proporcional à atividade mitocondrial das células que permaneceram vivas durante o ensaio (MOSMANN, 1983).

Em uma placa de 96 poços, foram plaqueados $0,5 \times 10^5$ macrófagos/ml, os quais foram incubados em estufa de CO₂ (5 %), a 37 °C *overnight*. Após adesão dos macrófagos à placa, os compostos foram adicionados e a viabilidade das células foi avaliada após 24 h de estímulos. Após 24 h, os sobrenadantes foram removidos e as células foram

incubadas com 200 µL de solução de MTT (1 mg/mL) em meio RPMI-1640 por 2 h. Então a solução foi removida, restando apenas as células. No interior das células que permaneceram viáveis ocorre a conversão do MTT à sal de formazan não hidrossolúvel. Posteriormente, o formazan foi solubilizado com 200 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) por 30 min sob agitação. Para análise da viabilidade celular, 100 µL da solução de DMSO com os sais de formazan solubilizados foram transferidas para placa de 96 poços e quantificadas em espectrofotômetro sob comprimento de onda de 550 nm. Os resultados foram expressos em porcentagem de redução, comparado ao grupo controle.

4.3.2 Determinação da expressão proteica por western blot

Os macrófagos e os tecidos congelados provenientes dos animais descritos anteriormente foram preparados em presença de tampão de extração [(Tris 0,05 M, cloreto de sódio (NaCl) 0.150 M, EDTA 0.001 M, Triton X-100 1%, Deoxicolato 1%, Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) 0.1 %, ortovanadato de sódio (Na₃VO₄) 0.001 M, fluoreto de sódio (NaF) 0.01 M e inibidor de proteases *SIGMAFASTTM Protease Inhibitor Tablets-S8820 1X*)] sob rotação durante 2 h a 4 °C. O homogenato foi centrifugado a 13000 rpm a 4 °C por 15 min para a remoção do material insolúvel. Após o processamento, o sobrenadante foi coletado e congelado na temperatura de -80 °C, até sua utilização. A concentração de proteínas das amostras foi mensurada de acordo com o método de Bradford (BRADFORD, 1976).

Para separação, foram aplicados 40 µg de proteínas em gel de SDS-PAGE. Após serem separadas em gel, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, que foi lavada em solução salina tamponada com Tween [TBS-T - Tris 0.2 M, NaCl 1.6, Tween 20 0.1 %] e incubada por 1 h em solução de bloqueio [TBS-T com

5 % de albumina de soro bovina (BSA)], para reduzir a ligação inespecífica de proteínas na membrana. Após o bloqueio, a membrana foi incubada *overnight* com o anticorpo primário específico. Os seguintes anticorpos primários foram utilizados: O-GlcNAc, OGA, OGT, NF- κ B (Tabela 1). Em seguida, a membrana foi incubada por 1 h com o anticorpo secundário conjugado a peroxidase (HRP) e, logo após, com a solução para detecção por quimioluminescência (kit ECL plus – Amersham Biosciences do Brasil Ltda). A intensidade das bandas foi quantificada por densitometria óptica através da utilização de programa de análise de intensidade de bandas (ImageJ®).

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

Anticorpo primário (diluição)	Anticorpo secundário (diluição)	Companhia
O-GlcNAc (1:500)	Camundongo (1:3000)	Sigma-Aldrich ¹
OGA (1:500)	Coelho (1:3000)	Abcam ³
OGT (1:500)	Coelho (1:3000)	Abcam ³
NF- κ B (1:500)	Coelho (1:3000)	Cell Signaling ²
GAPDH (1:5000)	Coelho (1:10000)	Sigma-Aldrich ¹
Histona H3 (1:8000)	Coelho (1:5000)	Abcam ³
β -actina (1:2000)	Camundongo (1:3000)	Millipore ⁴

¹Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA. ²Cell Signaling - Beverly, MA, USA. ³Abcam – Abcam Incorporated, Cambridge, MA, USA. ⁴Millipore - EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA.

4.3.3 Expressão gênica pela reação em cadeia da polimerase (PCR em tempo real)

A expressão gênica foi avaliada pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR em tempo real). O ácido ribonucléico (RNA) total foi extraído de artéria aorta, leito mesentérico ou macrófagos em cultura. A cada placa ou segmento de tecido foi adicionado 1 mL de Trizol® (Invitrogen). Após homogeneização em nitrogênio líquido

(para os tecidos), as amostras foram mantidas durante 15 min em temperatura ambiente, e centrifugadas a 12000 rpm a 4 °C por 10 min.

Após incubação, foram adicionados 200 µL de clorofórmio para 1 mL de Trizol®. Os tubos foram agitados vigorosamente durante 15 segundos (seg) e incubados por 2 a 3 min em temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas (12000 rpm a 4 °C por 15 min) e a fase aquosa (superior) foi transferida para outro tubo.

À fase aquosa foram adicionados 500 µL de isopropanol. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12000 rpm a 4 °C por 15 min. O sobrenadante foi desprezado e ao *pellet* foi adicionado 1 mL de etanol absoluto. As amostras foram agitadas em vórtex e centrifugadas a 7500 rpm a 4 °C por 15 min. Verteu-se o sobrenadante, e o *pellet* foi incubado à temperatura ambiente por 5-10 min. O *pellet* foi ressuspensionado em 16 µL de água tratada com Dietil Pirocarbonato (DEPC).

Posteriormente, a quantificação de RNA total foi realizada através de leitura em espectrofotômetro Epoch™ com placa de microvolumes Take3™ (BioTek) em filtro de 260/280 nm. O critério de pureza utilizado foi a razão 260/280 nm (ácido nucléico/proteína) de aproximadamente 1,8. Uma razão menor que 1,8 é indicativo de contaminação por proteínas. A concentração foi fornecida em ng/µL, e foram utilizados 2 µL de amostra para leitura.

A reação de transcrição reversa é o processo pelo qual o RNA é usado como um molde para sintetizar cDNA. Para a reação de transcrição reversa foi utilizado o Kit *Multiscrib reverse transcription* (Life Technologies). A reação foi preparada com 2 µL de tampão (10 x), 2 µL de solução de *primers* (sondas) randômicos (10 x), 0,8 µL de solução de dNTPs (25 x), 1 µL de solução de enzima Multiscrib RT (50 U/µL), 1 µL de inibidor de RNase (20 U/µL), 0,25 µL de solução de sondas oligo-dT (0,5 µg/µL), 5 µL de cada amostra de RNA (200 ng/µL), totalizando um volume de 20 µL.

As amostras foram incubadas a 25 °C por 10 min, a 37 °C por 120 min e a 85 °C por 5 min. O cDNA obtido foi armazenado a -20 °C até a realização das reações de PCR em tempo real.

A expressão dos genes foi determinada pela sonda TaqMan® (Thermo Fisher Scientific). Este sistema utiliza sonda fluorescente para permitir a detecção de produto específico conforme este se acumula durante os ciclos de PCR. Uma sonda (oligonucleotídeo) é construída contendo um corante sinalizador fluorescente na extremidade 5' e um corante silenciador na extremidade 3'. Enquanto a sonda está intacta, a proximidade do silenciador reduz bastante a fluorescência emitida pelo corante sinalizador através da transferência de energia por ressonância de fluorescência através do espaço. Se a sequência alvo estiver presente, a sonda se anela logo após um dos *primers* e é clivada pela atividade da nuclease 5' da Taq DNA polimerase enquanto o *primer* é estendido. Esta clivagem da sonda separa o corante sinalizador do corante silenciador, aumentando o sinal do primeiro, além de remover a sonda da fita alvo, permitindo que a extensão do primer continue até o final da fita molde.

As amostras foram incubadas a 50 °C por 2 min, em seguida a 95 °C por 10 min, seguidos de 40 ciclos de 95 °C por 15 seg e 60 °C por 1 min no aparelho StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

Foram analisados os seguintes genes (Life Technologies): IL-1 β (Mm00434228_m1), IL-6 (Mm02620446_s1), TNF- α (Mm00443260_g1) e beta-actina (Mm00607939_s1), usada como controle interno.

Foi fixado um valor limiar de expressão (*threshold*) para cada gene. O limiar é um nível de sinal utilizado para determinação do Ct (ciclo limiar ou *threshold cycle*) em ensaios de tempo real. Ele deve ser ajustado acima do sinal fluorescente de fundo emitido durante os primeiros ciclos antes do instrumento de PCR em tempo real detectar a

amplificação do produto (linha de base). O Ct é o número do ciclo no qual a fluorescência gerada dentro de uma reação cruza a linha limiar. Os valores de Ct são logarítmicos e são usados para as análises quantitativas. A expressão gênica foi analisada pelo método de $2^{\Delta\Delta Ct}$. Os valores de $2^{\Delta\Delta Ct}$ de cada amostra foram normalizados (log10).

4.3.4 Dosagem de citocinas

A quantificação das citocinas no soro e sobrenadante das culturas de macrófagos foi realizada pelo método imunoenzimático (ELISA, do inglês *Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay*) que se baseia em reações antígeno-anticorpo detectáveis através de reações enzimáticas.

O modelo utilizado foi o ELISA indireto, no qual a amostra (soro ou sobrenadante) é adicionada a um suporte sólido (placa de ELISA) contendo o antígeno aderido, na busca de anticorpos contra o antígeno. Se houver anticorpos no soro em teste ocorrerá a formação da ligação antígeno-anticorpo que, posteriormente, é detectada pela adição de um segundo anticorpo dirigido contra imunoglobulinas da espécie onde se busca detectar os anticorpos. O segundo anticorpo é geralmente ligado à peroxidase. Após adicionar o substrato apropriado para a enzima, nos poços em que ocorre a reação antígeno-anticorpo apresentarão coloração (variável dependendo da quantidade do substrato), desta forma é possível quantificar os resultados com base na leitura da densidade ótica em espectrofotômetro.

Para obtenção do soro, o sangue obtido dos animais com endotoxemia por LPS ou controles foi centrifugado a 500 g a 4 °C por 15 min. O sobrenadante da cultura de macrófagos foi obtido após estimulação das células com GlcN (5 mM, 30 min) e ThG (1 µmol/L, 12 h) e posterior estímulo com LPS (1 µg/mL, 6 h). O soro e o sobrenadante foram armazenados em freezer -80 °C até a realização dos experimentos.

Os ensaios para quantificação de IL-1 β , IL-6 e TNF- α foram realizados conforme descrito pelo fabricante dos kits (R&D Systems, USA). Em resumo, em placas de 96 poços foram adicionados 50 μ L/poço de soluções contendo os anticorpos de captura para cada citocina (anti-IL-1 β α murino 800 ng/ml; anti-IL-6 murino 800 ng/ml; anti-TNF- α murino 800 ng/ml). Os anticorpos foram diluídos em PBS acrescido de 10 % de soro bovino fetal e incubados nas placas por 12 h à 4 °C.

Posteriormente, as placas foram lavadas por três vezes com PBS/Tween-20 (0,05 %). As ligações não específicas foram bloqueadas com 100 μ L de PBS/BSA 1 % por 120 min em temperatura ambiente. As amostras e a curva padrão em volume final de 50 μ L/poço foram colocadas nas placas e incubada por 12 h à 4 °C.

Após esse período, as placas foram lavadas com PBS/Tween-20 (0,05 %) e 50 μ L dos anticorpos de detecção biotinilados específicos para cada citocina foram adicionados. Após uma hora, as placas foram lavadas com PBS/Tween-20 (0,05 %) e estreptoavidina-HRP (fornecida pelo fabricante do kit e diluída 1:250) foi adicionada aos poços. Após 30 min de incubação, as placas foram lavadas com PBS/Tween-20 (0,05 %), e 100 μ L do substrato TMB (tetrametilbenzidina - 1 mg/ml) acrescido de H₂O₂ (0,06 %) colocado em cada poço. As placas foram incubadas por 15 min em temperatura ambiente. A reação foi interrompida com 50 μ L de ácido sulfúrico (H₂SO₄, 1 M) e a densidade óptica aferida à 450 nm em espectrofotômetro (FlexStation 3, Molecular Devices). Os resultados foram expressos em picogramas/ml.

4.3.5 Quantificação da produção de óxido nítrico – ensaio de Griess

A formação de NO pela iNOS pode ser determinada indiretamente através da reação de *Griess* (GREEN et al., 1982), que quantifica o conteúdo de nitrito (NO₂⁻)

acumulado no sobrenadante de culturas celulares ou no soro dos animais com endotoxemia ou CLP, uma vez que o NO origina nitrito em solução aquosa.

Para dosagem de NO pelo método de *Griess*, 50 µL do sobrenadante da cultura de macrófagos ou soro dos animais foram incubados por 10 min (a temperatura ambiente) na presença de 50 µL da solução de *Griess*, constituída pela mistura 1:1 (v/v) das soluções: sulfanilamida 0,1 mol/L e ácido orto-fosfórico 30 %; e enediamina 7,7 mmol/L e ácido orto-fosfórico 60 %. O conteúdo de nitrito foi determinado utilizando-se uma curva de nitrito de sódio (NaNO₂) como padrão e a leitura da absorbância foi realizada a 550 nm.

4.3.6 Ensaio de luciferase em macrófagos RAW-luc estavelmente transfectados com o gene NF-κB

Foram utilizados macrófagos RAW 264.7 estavelmente transfectados com o gene NF-κB-pLuc para expressarem luciferase especificamente através do fator de transcrição NF-κB, como descrito por Cooper (COOPER et al., 2010). Os macrófagos foram cultivados em placas de 24 poços (6 x 10⁴ células/poço), incubadas em estufa de CO₂ (5 %), a 37 °C, *overnight*. Antes da realização dos experimentos, os sobrenadantes foram substituídos, com remoção das células não aderentes. Para o ensaio, as células cultivadas foram pré-tratadas com GlcN (5 mM, 30 min) e ThG (1 µmol/L, 12 h) antes da adição do estímulo de LPS (1 µg/mL) e novamente incubadas em estufa por 6 h.

Para a análise, as células foram lisadas com 50 µL de tampão de lise proveniente no kit *Luciferase Assay* (Promega), e mantidas a 4 °C por 20 min. Em seguida, uma alíquota (10 µL) foi retirada de cada poço e transferida para placa branca opaca de 96 poços, juntamente com 25 µL do reagente para ensaio de luciferase contendo luciferina. A ativação, especificamente, do fator de transcrição NF-κB nestas células, conduz a

transcrição do gene luciferase, e a atividade desta enzima pode ser quantificada pela emissão de fótons em unidades relativas de luz (RLU) detectada através do Luminômetro (FlexStation 3, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA), ao catalisar a reação de oxidação da luciferina, produzindo oxiluciferina e fótons.

4.3.7 Fracionamento do extrato citosólico e nuclear

Macrófagos provenientes de medula óssea de camundongos C57BL6/J foram cultivados como descrito anteriormente no item 4.1.2. As células cultivadas (macrófagos não diferenciados) foram pré-tratadas com veículo, GlcN (5 mM, 30 min) ou ThG (1 μ mol/L, 12 h) antes da adição do estímulo de LPS (1 μ g/mL), e novamente incubadas em estufa por 6 h. Os sobrenadantes foram removidos e descartados, e as células aderentes foram removidas por lavagem com 200 μ L do tampão de lise A (em mmol/L: KCl 10, EDTA 0.1, EGTA 0.1, DTT 1, PMSF 1 e NP-40 0.1 %, inibidor de proteases SIGMAFASTTM 1:50). As células foram transferidas para tubos e homogeneizadas, em vórtex, por 1 min para total lise do citoplasma, incubadas por 10 min no gelo e centrifugadas a 1000 g a 4°C por 5 min. O sobrenadante resultante foi coletado como extrato citoplasmático.

O *pellet* foi lisado pela adição de 50 μ L do tampão de lise B (em mmol/L: Hepes 20, EDTA 0.2, NaCl 420, MgCl₂ 1.5 e glicerol 25 % e inibidor de proteases SIGMAFASTTM 1:50) e homogeneizado em vórtex por 1 min e 30 seg; incubado por 30 min no gelo e centrifugado a 15000 g a 4°C por 10 min. O sobrenadante resultante foi coletado como extrato nuclear.

As amostras de citosol e núcleo tiveram seu teor de proteínas quantificado pelo método de Bradford e, posteriormente, foi realizado o protocolo de *western blot*, conforme descrito anteriormente. Como controle interno para a fração nuclear foi

utilizado o anticorpo para marcação da Histona H3, conhecido marcador constitutivo do núcleo celular.

4.4 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como a média $\pm$ erro padrão da média (EPM). Os resultados de *western blot* foram normalizados pelo grupo controle. Diferenças estatísticas foram analisadas pelo teste de análise de variância de uma via (ANOVA de uma via), seguido pelo pós-teste mais adequado para cada tipo de análise estatística, utilizando o programa GraphPad Prism[®] (versão 5.0 Prism, GraphPad, USA). Foram estabelecidos intervalos de confiança de 95%. O nível de significância mínima aceitável foi de $p < 0,05$. A sobrevida dos animais foi expressa como porcentagem de animais sobreviventes analisadas pelo teste log-rank (X^2 , qui-quadrado), e as diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$.

A resposta vasoconstritora induzida pela PE foi expressa como força de contração em mN e a vasodilatação induzida pela ACh como porcentagem de relaxamento em relação à contração induzida por PE. A contração da PE foi considerada como 100 % da resposta contrátil. A partir das curvas de concentração-resposta foram analisados parâmetros farmacológicos de E_{max} e pD_2 .

Resultados

5 RESULTADOS

Os resultados serão apresentados de acordo com os objetivos de cada protocolo experimental. Neste sentido, a questão a ser respondida será apresentada e, após breve fundamentação do protocolo experimental, os resultados obtidos em cada experimento serão descritos.

Qual tempo de tratamento e doses de glucosamina e Thiamet-G serão utilizados para aumentar sistemicamente os níveis de proteínas modificadas por O-GlcNAc?

5.1 Expressão dos níveis de proteínas glicosiladas

5.1.1 Expressão de proteínas glicosiladas em aorta de camundongos controle tratados com GlcN ou veículo

O tratamento de camundongos C57BL6/J com GlcN (300 mg/Kg, i.v.) aumentou a expressão de proteínas modificadas por O-GlcNAc em artéria aorta após 30 min e 1 h da administração. A análise da expressão dos níveis de proteínas glicosiladas foi realizada pela técnica de *western blot*, conforme ilustrado na Figura 2. Não foram observadas alterações significativas nos níveis de proteínas glicosiladas nos tempos subsequentes. Desta maneira, determinamos que a dose de 300 mg/Kg/i.v., 30 min antes da indução da endotoxemia por LPS é adequada para o nosso modelo experimental.

Figura 2. Expressão de proteínas glicosiladas em artéria aorta de camundongos dos grupos controle (salina) e tratados com glucosamina. As artérias foram coletadas 30 min, 1, 6 e 12 h após a administração de GlcN (300 mg/Kg; i.v.). (A) imagem representativa da expressão de proteínas glicosiladas; (B) gráfico de barras relativo à expressão de proteínas glicosiladas normalizada pela expressão de β-actina. Os resultados representam a média ± EPM, n=6 em cada grupo experimental. *p<0,05 vs. grupo controle (ANOVA seguido pelo pós-teste de Newman Keuls).

5.1.2 Expressão de proteínas glicosiladas em aorta de camundongos controle tratados com ThG ou veículo

Houve aumento da expressão de proteínas modificadas por *O*-GlcNAc em artéria aorta de camundongos controle, 12 h após o tratamento com ThG (150 µg/Kg, i.v.). A análise dos níveis de expressão de proteínas glicosiladas foi realizada pela técnica de *western blot*. Não foram observadas alterações significativas nos níveis de proteínas

glicosiladas nos tempos anteriores e subsequentes. Desta maneira, determinamos que a dose de 150 $\mu\text{g/Kg}$, i.v., 12 h antes da indução de endotoxemia com LPS é adequada para o nosso modelo experimental (Figura 3).

Figura 3. Expressão de proteínas glicosiladas em artéria aorta de camundongos dos grupos controle (salina) e tratados com Thiamet-G. As artérias foram coletadas 30 min, 1, 6, 12 e 24 h após a administração de ThG (150 $\mu\text{g/Kg}$; i.v.). (A) imagem representativa da expressão de proteínas glicosiladas; (B) gráfico de barras relativo à expressão de proteínas glicosiladas normalizada pela expressão de β -actina. Os resultados representam a média $\pm$ EPM, $n=6$ em cada grupo experimental. * $p<0,05$ vs. grupo controle (ANOVA seguido pelo pós-teste de Newman Keuls).

Uma vez estabelecidos doses e tempos para administração dos 2 compostos que aumentam a quantidade de proteínas glicosiladas, nosso próximo passo foi determinar:

Qual o efeito do aumento de proteínas O-GlcNAc na resposta inflamatória sistêmica e no sistema cardiovascular?

5.2 Resposta inflamatória

5.2.1 Efeito do aumento de O-GlcNAc no recrutamento de neutrófilos para a cavidade abdominal

Como descrito na metodologia, foi utilizado neste trabalho o modelo de endotoxemia severa induzida por LPS. Como esperado, a administração de LPS, na dose de 20 mg/Kg, i.p, aumentou a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal dos animais, com valores alcançando $0,22 \pm 0,03 \times 10^6$ neutrófilos/cavidade. Tal evento foi reduzido nos grupos tratados com GlcN (LPS sev + GlcN $0,09 \pm 0,02 \times 10^6$ neutrófilos/cavidade) e ThG (LPS sev + ThG $0,14 \pm 0,01 \times 10^6$ neutrófilos/cavidade) quando comparados com a migração observada em animais que receberam somente LPS (Figuras 4 e 5, respectivamente).

Figura 4. GlcN diminui a migração de neutrófilos para a cavidade abdominal em animais submetidos à endotoxemia por LPS. A contagem de neutrófilos na cavidade abdominal de animais com endotoxemia por LPS foi realizada através do aparelho Coulter®. Os resultados representam a média ± EPM e são representativos de dois diferentes experimentos (n=8). * $p < 0,05$ vs. grupo controle tratado com GlcN; # $p < 0,05$ vs. grupo LPS sev (ANOVA seguido pelo pós-teste de Newman Keuls).

Figura 5. ThG diminui a migração de neutrófilos para a cavidade abdominal em animais submetidos à endotoxemia por LPS. A contagem de neutrófilos na cavidade abdominal de animais com endotoxemia por LPS foi realizada através do aparelho Coulter®. Os resultados representam a média ± EPM e são representativos de dois diferentes experimentos (n=8). * $p < 0,05$ vs. grupo controle tratado com ThG; # $p < 0,05$ vs. grupo LPS sev (ANOVA seguido pelo pós-teste de Newman Keuls).

5.2.2 Efeito do aumento de O-GlcNAc no sequestro de neutrófilos pelo pulmão

A enzima MPO, presente em leucócitos da linhagem granulocítica e monocítica, representa a proteína mais abundante presente no interior dos neutrófilos (DAVIES, 2011). Possui atividade catalítica fundamental ao combate a microorganismos invasores. Ao liberar seus grânulos intracelulares para o exterior da célula, produz grandes quantidades de produtos oxidantes e altamente reativos, nocivos aos microorganismos, mas também aos tecidos (HAEGENS et al., 2008). A dosagem da enzima MPO em pulmão representa uma medida indireta do recrutamento de neutrófilos para o órgão.

Após 6 h da endotoxemia induzida por LPS, a dosagem de MPO no pulmão dos camundongos que receberam apenas LPS aumentou significativamente [(Unidades de mieloperoxidase / mg de tecido) $4687 \pm 380,7$]. Como observado nas Figuras 6 e 7, os tratamentos com GlcN e ThG, respectivamente, reduziram o sequestro de neutrófilos no pulmão de animais com endotoxemia induzida por LPS (LPS sev + GlcN $3127 \pm 347,3$; LPS sev + ThG $1877 \pm 188,7$).

Os resultados mostram que os tratamentos com GlcN e ThG, ou seja, o aumento de proteínas glicosiladas reduz o recrutamento no pulmão e a migração para a cavidade abdominal de células responsáveis pelo início do processo inflamatório, em comparação ao observado em animais sem tratamento.

Figura 6. GlcN reduz o sequestro de neutrófilos no pulmão de animais submetidos à endotoxemia severa por LPS. O sequestro de neutrófilos no pulmão de animais com endotoxemia severa foi estimado pelo ensaio da mieloperoxidase (MPO) no homogenato de pulmão depois de 6 h de indução da endotoxemia por LPS. Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM e são representativos de dois diferentes experimentos (n=8). * $p < 0,05$ vs. grupo controle tratado com GlcN; # $p < 0,05$ vs. grupo LPS sev (ANOVA seguido pelo pós-teste de Newman Keuls).

Figura 7. ThG reduz o sequestro de neutrófilos no pulmão de animais submetidos à endotoxemia severa por LPS. O sequestro de neutrófilos no pulmão de animais com endotoxemia severa foi estimado pelo ensaio da mieloperoxidase (MPO) no homogenato de pulmão depois de 6 h de indução da endotoxemia por LPS. Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM e são representativos de dois diferentes experimentos (n=8). * $p < 0,05$ vs. grupo controle tratado com ThG; # $p < 0,05$ vs. grupo LPS sev (ANOVA seguido pelo pós-teste de Newman Keuls).

Sabendo que uma resposta imune eficiente pode modular o processo inflamatório, mas que os altos níveis de citocinas circulantes durante o desencadeamento da sepse podem modular a falência de migração de neutrófilos, bem como o recrutamento dessas células a órgãos-alvo, nossa próxima pergunta foi:

Qual o efeito do aumento de proteínas O-GlcNAc na liberação sistêmica e produção local (vasos) de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 e IL-6)?

5.2.3 Efeito do aumento de O-GlcNAc na liberação sistêmica de mediadores inflamatórios

Para avaliar os níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF- α no soro dos animais com endotoxemia, utilizamos método imunoenzimático (ELISA) e para avaliar a expressão vascular destas citocinas, realizamos quantificação da expressão gênica pelo método de PCR em tempo real em aorta e artérias mesentéricas de animais com endotoxemia induzida por LPS tratados com veículo, GlcN e ThG.

Nos animais com endotoxemia que receberam apenas a administração de LPS, a coleta do soro e realização do ELISA demonstraram que os valores sistêmicos para todas as citocinas testadas foram expressivos: IL-1 β $393,9 \pm 70,1$; IL-6 $498,6 \pm 27,6$ e TNF- α $354,3 \pm 32,1$ pg/mL (Figura 8). O tratamento com GlcN reduziu a liberação dos mediadores inflamatórios IL-1 β , IL-6 e TNF- α (LPS sev + GlcN: IL-1 β $158,4 \pm 33,1$; IL-6 $451,6 \pm 8,9$ e TNF- α $142,2 \pm 19,5$ pg/mL), em relação ao observado em animais com endotoxemia por LPS e que receberam veículo.

Figura 8. O tratamento com GlcN reduz liberação de citocinas sistêmicas. O soro foi obtido 6 h após o tratamento e a indução da endotoxemia por LPS. As concentrações séricas de (A) IL-1 β , (B) IL-6 e (C) TNF- α (pg/ml) foram avaliadas por ELISA. Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM de unidades/ml de soro e são representativos de dois diferentes experimentos (n=8). * p < 0,05 vs. grupo controle tratado com GlcN; # p < 0,05 vs. grupo LPS sev (ANOVA seguido pelo pós-teste de Newman Keuls).

Como podemos observar na Figura 9, o tratamento com ThG reduziu os níveis sistêmicos das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF- α (LPS sev + ThG: IL-1 β 178,3 $\pm$ 37,3; IL-6 233,9 $\pm$ 11,6 e TNF- α 280,7 $\pm$ 20,9 pg/mL), corroborando os resultados obtidos no tratamento com GlcN.

Figura 9. O tratamento com ThG reduz liberação de citocinas sistêmicas. O soro foi obtido 6 h após o tratamento e a indução da endotoxemia por LPS. As concentrações séricas de (A) IL-1 β , (B) IL-6 e (C) TNF- α (pg/ml) foram avaliadas por ELISA. Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM de unidades/ml de soro (n=3-8). * p < 0,05 vs. grupo controle tratado com ThG; # p < 0,05 vs. grupo LPS sev (ANOVA seguido pelo pós-teste de Newman Keuls).

Esses resultados corroboram evidências prévias da literatura, citadas anteriormente, demonstrando que o tratamento com GlcN reduz os níveis de citocinas pró-inflamatórias circulantes.

O tratamento com GlcN de animais que receberam LPS reduziu a expressão gênica das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF- α tanto em aorta quanto em artérias mesentéricas, em relação ao grupo LPS sev tratado com veículo (Figura 10).

De maneira semelhante ao tratamento com GlcN, a expressão do mRNA das citocinas pró-inflamatórias foi menor em aorta e artérias mesentéricas dos animais dos grupos tratados com ThG em relação aos animais que receberam veículo (Figura 11).

Os resultados corroboram os observados na dosagem sistêmica dos mesmos mediadores inflamatórios, uma vez que os tratamentos com GlcN e ThG reduziram a expressão vascular (aorta e artérias mesentéricas) desses mediadores inflamatórios nos grupos estudados.

AORTA **LEITO MESENTÉRICO**

Figura 10. O tratamento com GlcN reduz a expressão gênica de citocinas em aorta e leito mesentérico de animais com endotoxemia. Os tecidos foram coletados 6 h após a indução da endotoxemia severa por LPS. A análise da expressão de (A) IL-1 β , (B) IL-6 e (C) TNF- α na aorta e (D) IL-1 β , (E) IL-6 e (F) TNF- α no leito mesentérico foi realizada por PCR em tempo real. Os valores foram normalizados pelo produto correspondente da reação de PCR em tempo real para β -actina. Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM de mRNA ($2^{-\Delta\Delta CT}$) (n=6). * $p < 0,05$ vs. grupo controle tratado com GlcN; # $p < 0,05$ vs. grupo LPS sev (ANOVA seguido pelo pós-teste de Newman Keuls).

AORTA **LEITO MESENTÉRICO**

Figura 11. O tratamento com ThG reduz a expressão gênica das citocinas em aorta e leito mesentérico de animais com endotoxemia. Os tecidos foram coletados 6 h após a indução da endotoxemia severa por LPS. A análise da expressão de (A) IL-1 β , (B) IL-6 e (C) TNF- α na aorta e (D) IL-1 β , (E) IL-6 e (F) TNF- α no leito mesentérico foi realizada por PCR em tempo real. Os valores foram normalizados pelo produto correspondente da reação de PCR em tempo real para β -actina. Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM de mRNA ($2^{-\Delta\Delta CT}$) (n=6). * $p < 0,05$ vs. grupo controle tratado com ThG; # $p < 0,05$ vs. grupo LPS sev (ANOVA seguido pelo pós-teste de Newman Keuls).

5.3 Resposta no sistema cardiovascular

5.3.1 Efeito do aumento de O-GlcNAc na hipotensão observada nos animais com endotoxemia por LPS

Além da liberação de diversas moléculas pró-inflamatórias, alterações hemodinâmicas substanciais participam do agravamento no quadro de sepse. Podemos observar na Figura 12 acentuada queda da pressão arterial média (PAM) em animais do grupo LPS sev, com valores de PAM chegando a $51,25 \pm 3,2$ mmHg após 6 h da administração de LPS, corroborando os dados da literatura. Nos animais tratados previamente com GlcN, apesar de ainda ocorrer hipotensão arterial, houve recuperação parcial ou aumento significativo em relação aos animais que receberam somente LPS, com valores de PAM de $77,5 \pm 4,1$ mmHg. O tratamento com GlcN não produziu efeitos na PAM de animais controle (Cont $98,0 \pm 4,0$ e Cont + GlcN $106,5 \pm 4,3$ mmHg).

Figura 12. O tratamento com GlcN atenua a hipotensão arterial na endotoxemia por LPS. A pressão arterial média (PAM) foi registrada por canulação da artéria carótida durante 6 h após a administração de LPS (20 mg/Kg/i.p.). O tratamento com GlcN foi realizado 30 min antes da injeção de LPS. n=4. * $p < 0,05$ vs. grupo controle tratado com GlcN; # $p < 0,05$ vs. grupo LPS sev (ANOVA seguido pelo pós-teste de Newman Keuls).

5.3.2 Efeito do aumento de *O*-GlcNAc na reatividade vascular

Os estudos de reatividade vascular, utilizando aorta torácica dos animais dos grupos estudados, demonstraram que a endotoxemia por LPS não modificou as respostas vasculares a fenilefrina (PE), agonista de alfa-adrenoceptores, ou a acetilcolina (ACh), vasodilatador dependente de endotélio (Figura 13).

Figura 13. Não ocorrem alterações de reatividade vascular em aorta 6 h após indução de endotoxemia por LPS. (A) Curvas concentração-resposta para fenilefrina (PE) foram realizadas em aortas de animais controle, controle + GlcN, LPS sev e LPS sev + GlcN. (B) Curvas concentração-resposta para acetilcolina (ACh) foram realizadas em aortas de animais controle, controle + GlcN, LPS sev e LPS sev + GlcN. Os pontos representam a média $\pm$ EPM dos valores de contração e/ou relaxamento (n=4-5).

Tabela 2. Tratamento com GlcN não altera valores de E_{max} e pD_2 para PE e ACh em aortas de camundongos controle e com endotoxemia severa.

	PE		ACh	
	E_{max}	pD_2	E_{max}	pD_2
Cont	5,71 $\pm$ 0,14	6,70 $\pm$ 0,52	95,87 $\pm$ 2,22	6,86 $\pm$ 0,08
Cont + GlcN	6,05 $\pm$ 0,54	6,72 $\pm$ 0,67	97,27 $\pm$ 1,06	6,80 $\pm$ 0,04
LPS sev	5,56 $\pm$ 0,28	6,36 $\pm$ 0,48	96,15 $\pm$ 1,88	6,69 $\pm$ 0,07
LPS sev + GlcN	5,50 $\pm$ 0,22	6,68 $\pm$ 0,55	96,23 $\pm$ 2,21	6,83 $\pm$ 0,08

Valores de E_{max} e pD_2 para contração da PE e relaxamento da ACh em aorta de animais com endotoxemia por LPS e tratados com GlcN. Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM dos valores de contração e/ou relaxamento (n=4-5).

Os estudos de reatividade vascular realizados com os agonistas PE e ACh em ramos de artéria mesentérica de resistência demonstram que a endotoxemia severa reduziu a resposta contrátil nesses vasos (Figura 14). O tratamento com GlcN promoveu aumento, mas não normalizou, a resposta contrátil a PE, que continuou significativamente menor que a resposta contrátil observada nos grupos controle e controle + GlcN. Por outro lado, a resposta relaxante a ACh, que estava reduzida em animais tratados com LPS, não foi modificada pelo tratamento com GlcN.

Figura 14. O tratamento com GlcN aumenta a resposta contrátil a PE após 6 h de indução de endotoxemia por LPS. (A) Curvas concentração-resposta para fenilefrina (PE) foram realizadas em artérias mesentéricas de animais controle, controle + GlcN, LPS sev e LPS sev + GlcN. (B) Curvas concentração-resposta para acetilcolina (ACh) foram realizadas em artérias mesentéricas de animais controle, controle + GlcN, LPS sev e LPS sev + GlcN. Os pontos representam a média $\pm$ EPM dos valores de contração e/ou relaxamento ($n=4$). * $p < 0,05$ vs. grupo controle tratado com GlcN (ANOVA seguido pelo pós-teste de Newman Keuls).

Figura 15. Efeito do tratamento com GlcN sobre os valores de E_{max} e pD_2 para PE e ACh em artéria mesentérica. Valores de E_{max} e pD_2 para contração da PE e relaxamento da ACh em artérias mesentéricas de animais com endotoxemia por LPS e tratados com GlcN. Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM dos valores de contração ($n=4$). * $p < 0,05$ vs. grupo controle tratado com GlcN; # $p < 0,05$ vs. grupo LPS sev (ANOVA seguido pelo pós-teste de Newman Keuls).

Tabela 3. Efeito do tratamento com GlcN sobre os valores de E_{max} e pD_2 para PE e ACh em artérias mesentéricas de camundongos controle e com endotoxemia severa.

	PE		ACh	
	E_{max}	pD_2	E_{max}	pD_2
Cont	$12,69 \pm 0,73$	$7,65 \pm 0,14$	$87,18 \pm 2,89$	$7,65 \pm 0,08$
Cont + GlcN	$11,75 \pm 0,54$	$7,76 \pm 0,12$	$95,04 \pm 4,51$	$7,39 \pm 0,11$
LPS sev	$8,40 \pm 0,49$ *	$6,76 \pm 0,10$ *	$66,70 \pm 1,40$ *	$7,03 \pm 0,08$ *
LPS sev + GlcN	$9,53 \pm 0,30$ *	$7,37 \pm 0,07$ *,#	$66,56 \pm 2,89$ *	$7,48 \pm 0,10$ #

Valores de E_{max} e pD_2 para contração da PE e relaxamento da ACh em ramos de artéria mesentérica de animais com endotoxemia por LPS e tratados com GlcN. Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM dos valores de contração e/ou relaxamento ($n=4$). * $p < 0,05$ vs. grupo controle tratado com GlcN; # $p < 0,05$ vs. grupo LPS sev (ANOVA seguido pelo pós-teste de Newman Keuls).

5.3.3 Efeitos do tratamento com GlcN e ThG na sobrevida dos animais submetidos a endotoxemia por LPS

A taxa de sobrevida em animais submetidos à endotoxemia por LPS e tratados com GlcN foi significativamente maior que aquela em animais submetidos à endotoxemia e que receberam veículo. O aumento agudo de *O*-GlcNAc com GlcN, antes da aplicação do LPS, aumentou a sobrevida dos animais que receberam LPS em 50 % (Figura 16).

O aumento agudo de *O*-GlcNAc com ThG também aumentou a sobrevida dos animais tratados com LPS em 60 % (Figura 17). Os animais foram acompanhados durante sete dias após a indução de endotoxemia severa.

Esses resultados mostram que tanto o tratamento com GlcN, quanto com ThG e, consequentemente, o aumento de proteínas *O*-GlcNAc, melhora o quadro da endotoxemia por LPS.

Desta maneira, nossos estudos subsequentes se concentraram nos mecanismos pelos quais a GlcN e ThG atenuam os eventos associados à endotoxemia. Estes estudos são importantes porque podem desvendar vias que representam possíveis alvos terapêuticos para o tratamento da endotoxemia por LPS.

Figura 16. O tratamento com GlcN aumenta a sobrevivência de animais submetidos à indução de endotoxemia severa por LPS. Os animais C57BLJ/6 receberam tratamento com glucosamina (GlcN, 300 mg/Kg) ou solução salina (Cont), via i.v. 30 min antes da injeção i.p. de LPS (20 mg/Kg). A sobrevivência dos camundongos submetidos a endotoxemia foi avaliada diariamente por um período de sete dias. Os resultados estão expressos como % de sobrevivência (n=10 camundongos por grupo). * $p < 0,05$ vs. grupo controle; # $p < 0,05$ vs. grupo LPS sev (Teste de log-rank).

Figura 17. O tratamento com ThG aumenta a sobrevivência de animais submetidos à indução de endotoxemia severa por LPS. Os animais C57BLJ/6 receberam tratamento com Thiamet-G (ThG, 150 µg/Kg) ou solução salina (Cont), via i.v. 12 h antes da injeção i.p. de LPS (20 mg/Kg). A sobrevivência dos camundongos submetidos a endotoxemia foi avaliada diariamente por um período de sete dias. Os resultados estão expressos como % de sobrevivência (n=10 camundongos por grupo). * $p < 0,05$ vs. grupo controle; # $p < 0,05$ vs. grupo LPS sev (Teste de log-rank).

Conclusões parciais 1

O aumento agudo de proteínas modificadas por *O*-GlcNAc em animais submetidos a endotoxemia por LPS:

- Reduz a infiltração para o pulmão e a migração para a cavidade abdominal de neutrófilos, células responsáveis pelo início do processo inflamatório;
- Diminui os níveis séricos e a expressão vascular de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e TNF- α);
- Atenua a hipotensão arterial e a refratariedade a estímulos vasoconstritores causadas pela endotoxemia;
- Aumenta a taxa de sobrevida dos animais.

Os resultados apresentados até aqui demonstram que o aumento de proteínas *O*-GlcNAc melhora o quadro de endotoxemia por LPS. A fim de confirmar os resultados de nossos experimentos e considerando que na clínica os pacientes, muitas vezes, adentram ao hospital com quadro de sepse já instalado, nos perguntamos se o efeito do tratamento observado na endotoxemia por LPS seria equivalente em um dos modelos que mais se assemelham as condições de sepse na prática clínica, o modelo de ligadura e perfuração do ceco (CLP). Portanto, nossa próxima pergunta foi:

Qual o efeito do aumento de proteínas O-GlcNAc na resposta inflamatória sistêmica após indução de CLP?

Um dos principais modelos animais de experimentação que simula as condições de sepse prevalentes na prática clínica é representado pelo modelo de ligadura e perfuração do ceco (CLP). Desta forma, para avaliar os efeitos do tratamento com GlcN na sobrevida dos animais utilizamos o modelo de CLP, que consiste em injúria intestinal na altura da válvula íleo-cecocolica com consecutiva liberação de flora microbiana. O modelo de CLP tem origem polimicrobiana advinda da infecção focal, produz septicemia, libera produtos bacterianos, levando a ativação maciça dos sistemas de defesa do organismo, principalmente aqueles relacionados ao sistema imune, e produção de grandes quantidades de mediadores inflamatórios, especialmente de citocinas como fator de necrose tumoral e interleucinas (HUBBARD et al., 2005).

5.4 Efeitos do tratamento com GlcN nos animais com CLP

Com o intuito de mimetizar o que ocorre em termos fisiopatológicos com pacientes sépticos graves, utilizamos um modelo de sepse polimicrobiana grave (CLP letal, caracterizado por induzir 100 % de mortalidade), seguido de tratamento com antibiótico (protocolo descrito na seção 4.2.4).

Em nossas observações, os animais sépticos não tratados apresentaram letargia, piloereção, secreção ocular, taquipnéia e taquicardia, com 100 % de mortalidade nas primeiras 24 h após a CLP. Os animais submetidos ao modelo de sepse polimicrobiana grave, de maneira geral, apresentam descontrole do crescimento bacteriano, resultando em sua mortalidade. Os animais tratados com antibiótico, apresentaram redução da mortalidade associada ao quadro de sepse, com significativo aumento na taxa de sobrevida de 50 % (Figura 18).

O aumento agudo de *O*-GlcNAc, induzido pelo tratamento com GlcN, 1 h após a cirurgia de CLP, associado ao tratamento com antibiótico e reposição de volume, aumentou a sobrevida dos camundongos em relação aos animais submetidos a CLP e tratados apenas com antibiótico e reposição de volume (Figura 18). Os animais foram acompanhados a cada 12 h, durante sete dias consecutivos após a indução de CLP.

Figura 18. O tratamento com GlcN aumenta a sobrevivência de animais submetidos à CLP. Os animais C57BLJ/6 submetidos a ligação e perfuração do ceco (CLP) foram tratados via subcutânea com antibiótico ertapenem sódico (ATB, 30mg/kg), 1 h após cirurgia. O tratamento com ATB foi mantido em intervalo de 12 h, por 3 dias. O grupo GlcN + ATB recebeu tratamento intravenoso com glucosamina (GlcN, 300 mg/Kg), juntamente com o antibiótico. A sobrevivência dos camundongos submetidos a CLP foi avaliada diariamente por um período de sete dias. Os resultados estão expressos como % de sobrevivência (n=8 camundongos por grupo). * $p < 0,05$ vs. Sham; # $p < 0,05$ vs. grupo CLP + ATB (Teste de log-rank).

Seguindo o mesmo perfil de melhora na sobrevivência dos animais com endotoxemia induzida por LPS, o tratamento com GlcN e, consequentemente, o aumento de proteínas modificadas por *O*-GlcNAc, melhorou o quadro de sepse polimicrobiana dos animais submetidos à CLP.

Esses resultados, avaliando os efeitos de *O*-GlcNAc em dois modelos experimentais (endotoxemia por LPS e CLP) demonstram que o aumento de proteínas *O*-GlcNAc pode representar uma nova estratégia terapêutica para o tratamento de pacientes com quadro de septicemia, podendo reduzir a frequência de complicações associadas a mortalidade e morbidade em humanos.

Além disso, considerando que na clínica os pacientes, muitas vezes, adentram ao hospital com quadro de sepse já instaurado, avaliamos, além da sobrevivência dos animais com CLP, outros parâmetros que estão relacionados ao quadro de sepse.

A figura 19 demonstra que o tratamento com GlcN aumentou significativamente a migração de neutrófilos para a cavidade abdominal de camundongos submetidos a CLP (grupo CLP + ATB + GlcN) quando comparada à migração observada em animais submetidos a CLP e que receberam apenas tratamento com antibiótico (grupo CLP + ATB) - Sham $0,51 \pm 0,39$; CLP $1,78 \pm 0,41$; CLP + ATB $2,73 \pm 0,62$ e CLP + ATB + GlcN $6,07 \pm 1,26 \times 10^6$ neutrófilos/cavidade.

A migração de neutrófilos para o local de infecção é extremamente importante para o controle do crescimento e, conseqüentemente, para prevenção da disseminação de bactérias. Durante a sepse induzida pela cirurgia de CLP ocorre falha na migração de neutrófilos para a região da infecção e, como consequência, aumento da mortalidade (FARIAS BENJAMIM et al., 2002). O aumento de proteínas glicosiladas preveniu a falha de migração dos neutrófilos na CLP e pode ser um dos motivos pelos quais observamos aumento da sobrevivência no grupo CLP + ATB + GlcN.

Os níveis da enzima MPO em animais com CLP apresentaram significativo aumento em relação ao grupo Sham (Sham $732 \pm 161,2$ e CLP $2597 \pm 388,2$), indicando resposta inflamatória neutrofílica e lesão tecidual no pulmão em consequência à CLP (figura 20). O tratamento com GlcN reduziu significativamente o sequestro de neutrófilos no pulmão de animais com CLP, quando comparado ao sequestro de neutrófilos observado em animais dos grupos CLP e CLP + ATB (CLP + ATB $2363 \pm 395,7$ e CLP + ATB + GlcN $1299 \pm 212,2$). Desta forma, o tratamento com GlcN reduziu o recrutamento no pulmão de células responsáveis pelo início do processo inflamatório em animais submetidos a CLP.

Figura 19. Avaliação da migração de neutrófilos para a cavidade abdominal em animais submetidos à CLP e tratados com GlcN. A contagem de neutrófilos na cavidade abdominal de animais com CLP foi realizada através do aparelho Coulter®. Os resultados representam a média $\pm$ EPM (n=4-7). * $p < 0,05$ vs. grupo Sham; # $p < 0,05$ vs. grupo CLP e CLP + ATB (ANOVA seguido pelo pós-teste de Newman Keuls).

Figura 20. Avaliação do sequestro de neutrófilos no pulmão em animais submetidos à CLP tratados com GlcN. O sequestro de neutrófilos no pulmão de animais com CLP foi estimado pelo ensaio da mieloperoxidase (MPO) no homogenato de pulmão depois de 6 h de indução da CLP. Os resultados representam a média $\pm$ EPM (n=4-7). * $p < 0,05$ vs. grupo Sham; # $p < 0,05$ vs. grupo CLP e CLP + ATB (ANOVA seguido pelo pós-teste de Newman Keuls).

Como podemos verificar na Figura 21, os valores sistêmicos para a citocina IL-6 são expressivos, alcançando níveis de $2340 \pm 288,1$ pg/mL (CLP) e $1846 \pm 109,7$ pg/mL (CLP + ATB) em camundongos submetidos a CLP, após coleta do soro e realização do protocolo ELISA. O tratamento com GlcN reduziu a liberação de IL-6 ($1461 \pm 171,9$ pg/mL) em relação aos animais com CLP.

Figura 21. O tratamento com GlcN reduz níveis sistêmicos da citocina IL-6. O soro foi obtido 6 h após a indução de CLP. A concentração sérica de IL-6 (pg/ml) foi avaliada por ELISA. Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM de unidades/ml de soro (n=4-7). * $p < 0,05$ vs. grupo Sham; # $p < 0,05$ vs. grupo CLP e CLP + ATB (ANOVA seguido pelo pós-teste de Newman Keuls).

Conclusões parciais 2

Em relação ao aumento agudo de proteínas modificadas por *O*-GlcNAc em animais submetidos a ligadura e perfuração do ceco, podemos concluir que o mesmo:

- Aumenta a migração de células de defesa para a cavidade abdominal e reduz o recrutamento dessas células para o pulmão;
- Diminui os níveis séricos da citocina pró-inflamatória IL-6;
- Aumenta a porcentagem de sobrevida.

A partir da avaliação dos resultados apresentados até o momento, nossa próxima pergunta foi:

Quais os possíveis mecanismos pelos quais o aumento agudo de proteínas O-GlcNAc reduz os processos inflamatórios e atenua os eventos cardiovasculares associados a endotoxemia por LPS?

5.5 Mecanismos envolvidos nos efeitos do aumento de O-GlcNAc em animais com endotoxemia por LPS

5.5.1 Efeito do aumento de O-GlcNAc na expressão gênica vascular da isoforma induzível da óxido nítrico sintase (iNOS) em leito mesentérico

O tratamento com LPS promoveu aumento da expressão gênica da iNOS no leito mesentérico de camundongos. Os tratamentos com GlcN e ThG atenuaram o aumento da expressão gênica da iNOS no leito mesentérico dos grupos de animais estudados (Figura 22).

Figura 22. O tratamento com GlcN e ThG reduz a expressão gênica da iNOS em tecido mesentérico de animais com endotoxemia. O tecido foi coletado 6 h após a indução da endotoxemia por LPS em animais tratados com GlcN (A) ou ThG (B). A análise da expressão de iNOS (pg/ml) foi realizada por PCR em tempo real. Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM de mRNA ($2^{-\Delta\Delta CT}$) (n=6). * $p < 0,05$ vs. grupo controle tratado com GlcN; # $p < 0,05$ vs. grupo LPS sev (ANOVA seguido pelo pós-teste de Newman Keuls).

5.5.2 Efeito do aumento de O-GlcNAc nos níveis sistêmicos de nitrito (quantificação indireta de NO) em animais com endotoxemia por LPS

A administração de LPS promoveu aumento significativo dos níveis sistêmicos de nitrito. O tratamento com GlcN diminuiu os níveis sistêmicos de nitrito, em animais com endotoxemia severa por LPS (Figura 23 A). Os resultados corroboram os observados nos estudos de reatividade vascular e expressão gênica de iNOS que foram descritos anteriormente. O tratamento com ThG também reduziu os níveis sistêmicos de nitrito (Figura 23 B).

Figura 23. Os tratamentos com GlcN e ThG diminuem os níveis sistêmicos de nitrito em animais com endotoxemia por LPS. O soro foi coletado 6 h após a indução da endotoxemia por LPS em animais tratados com GlcN (A) ou ThG (B). A análise da produção de nitrito foi realizada pelo método de Griess. Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM em $\mu\text{mol/L}$ de nitrito ($n=6$). * $p < 0,05$ vs. grupo controle tratado com GlcN; # $p < 0,05$ vs. grupo LPS sev (ANOVA seguido pelo pós-teste de Newman Keuls).

Os macrófagos são alvos comuns em estudos que envolvem respostas inflamatórias por apresentarem papel crítico nos processos iniciais, de manutenção e resolução do processo inflamatório (FUJIWARA; KOBAYASHI, 2005). A ativação e aumento da produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , IL-6 e TNF- α e também a expressão de iNOS em macrófagos são muito bem documentadas. Desta maneira, achamos importante verificar os efeitos do aumento de proteínas glicosiladas no perfil inflamatório de macrófagos estimulados com LPS e questionamos:.

Aumento agudo de proteínas O-GlcNAc modifica a função de macrófagos?

Quais os possíveis mecanismos moleculares modulados pelo aumento agudo de proteínas O-GlcNAc em macrófagos estimulados com LPS?

5.6 Efeito do aumento de proteínas glicosiladas em cultura de macrófagos

5.6.1 Efeito do aumento de O-GlcNAc na liberação e expressão de mediadores inflamatórios em macrófagos estimulados com LPS

Macrófagos provenientes da medula óssea de camundongos (C57BLJ/6) foram estimulados com GlcN ou ThG antes da exposição ao LPS, a fim de mimetizar o tratamento realizado até então *in vivo*. Como podemos observar na figura 24, o tratamento com GlcN reduziu a liberação de IL-1 β (Figura 24 A) no sobrenadante de cultura de macrófagos estimulados *in vitro* com LPS (LPS $1276 \pm 117,2$; LPS + GlcN $783,7 \pm 108,1$ pg/mL). Não verificamos diferenças nos níveis das outras citocinas, IL-6 e TNF- α , entre os grupos estudados, possivelmente por serem citocinas expressas e/ou liberadas mais tardiamente que a IL-1 β . Este dado por ser corroborado quando analisamos a

expressão gênica destas citocinas. Como pode ser verificado na figura 25, houve diminuição da expressão das três citocinas analisadas em macrófagos estimulados com LPS e tratados com GlcN. Sendo assim, é possível que em tempos maiores de estímulo os níveis de todas as citocinas diminuirão em relação ao grupo de células estimuladas apenas com LPS.

Figura 24. O tratamento com GlcN reduz a liberação IL-1 β em sobrenadante de cultura de macrófagos. O sobrenadante foi obtido 6 h após o estímulo com LPS. As concentrações séricas de (A) IL-1 β , (B) IL-6 e (C) TNF- α (pg/ml) foram avaliadas por ELISA. Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM de unidades/ml de sobrenadante (n=4). * p < 0,05 vs. grupo controle tratado com GlcN; # p <0,05 vs. grupo LPS (ANOVA seguido pelo pós-teste de Newman Keuls).

Figura 25. O tratamento com GlcN reduz a expressão gênica das citocinas em cultura de macrófagos estimulados com LPS. As células foram coletadas 6 h após estímulo com LPS. A análise das expressões de (A) IL-1 β , (B) IL-6 e (C) TNF- α foram realizadas por PCR em tempo real. Os valores foram normalizados pelo produto correspondente da reação de PCR em tempo real para β -actina. Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM de mRNA ($2^{-\Delta\Delta CT}$) (n=4). * p < 0,05 vs. grupo controle tratado com GlcN; # p <0,05 vs. grupo LPS (ANOVA seguido pelo pós-teste de Newman Keuls).

O tratamento prévio com ThG reduziu tanto a liberação (Figura 26) quanto a expressão (Figura 27) das citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e TNF- α), analisadas por ELISA e PCR-RT, respectivamente, em cultura de macrófagos provenientes da medula óssea de camundongos C57BLJ/6. Os resultados corroboram os observados na dosagem sistêmica dos mesmos mediadores inflamatórios, uma vez que o aumento de proteínas modificadas por *O*-GlcNAc reduziu a liberação desses mediadores inflamatórios após o estímulo com LPS.

Figura 26. O tratamento com ThG reduz a liberação de citocinas pró-inflamatórias em sobrenadante de cultura de macrófagos. O sobrenadante foi obtido 6 h após o estímulo com LPS. As concentrações séricas de (A) IL-1 β , (B) IL-6 e (C) TNF- α (pg/ml) foram avaliadas por ELISA. Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM de unidades/ml de sobrenadante (n=4). * p <0,05 vs. grupo controle tratado com ThG; # p <0,05 vs. grupo LPS (ANOVA seguido pelo pós-teste de Newman Keuls).

Figura 27. O tratamento com ThG reduz a expressão gênica de citocinas em cultura de macrófagos estimulados com LPS. As células foram coletadas 6 h após estímulo com LPS. A análise das expressões de (A) IL-1 β , (B) IL-6 e (C) TNF- α foram realizadas por PCR em tempo real. Os valores foram normalizados pelo produto correspondente da reação de PCR em tempo real para β -actina. Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM de mRNA (2^{- $\Delta\Delta$ CT}) (n=4). * p <0,05 vs. grupo controle tratado com ThG; # p <0,05 vs. grupo LPS (ANOVA seguido pelo pós-teste de Newman Keuls).

Considerando estudos anteriores e nossa observação que aumento agudo de proteínas *O*-GlcNAc diminuiu a expressão de citocinas inflamatórias, um dos possíveis mecanismos envolvidos nas ações de *O*-GlcNAc poderia ser a inibição da atividade do fator de transcrição NF- κ B, o que resultaria em redução da liberação de citocinas pró-inflamatórias, como as estudadas neste trabalho, IL-1 β , IL-6 e TNF- α . A fim de testar esta hipótese, foram realizados experimentos visando quantificar a atividade do NF- κ B e sua translocação para o núcleo pela marcação da subunidade p65.

Para confirmar possível regulação em nível transcricional por *O*-GlcNAc sobre eventos associados à inflamação, macrófagos RAW-luc (células cuja região promotora do NF- κ B está associada à sequência que codifica para a luciferase) foram incubados com GlcN e ThG para determinar a presença de redução na ativação do NF- κ B, em relação a células incubadas somente com LPS (Figura 28).

Em ausência de estímulos inflamatórios, o fator NF- κ B encontra-se no citoplasma ligado a uma proteína inibitória, o I κ B. Esse complexo impede a translocação do NF- κ B para o núcleo. Em presença de estímulo inflamatório, o complexo I κ B/NF- κ B dissocia-se permitindo o transporte do NF- κ B para o núcleo, com consequente aumento da expressão de diversos genes-alvo.

Figura 28. GlcN e ThG reduz ativação do NF-κB induzida por LPS. Macrófagos RAW 264.7, estavelmente transfectados com o gene indutor da expressão de luciferase dependente de NF-κB, foram pré-tratados com GlcN ou ThG antes do estímulo com LPS. A atividade de NF-κB foi determinada 6 h após incubação com LPS. Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM, RLU: unidades relativas de luminescência (n=8). * $p < 0,05$ vs. grupo controle; # $p < 0,05$ vs. grupo LPS (ANOVA seguido pelo pós-teste de Newman Keuls).

Além do ensaio de atividade da luciferase, a translocação do NF-κB para o núcleo foi avaliada por *western blot* pela marcação da subunidade p65. Na figura 29, pode-se verificar expressão de proteínas nucleares extraídas de macrófagos provenientes de medula óssea de camundongos C57BL6/J estimulados com LPS, tratados com GlcN e ThG ou veículo. O estímulo com LPS aumentou a expressão da subunidade p65 do NF-κB na fração nuclear. O tratamento prévio das células com GlcN e ThG inibiu a translocação da p65 para o núcleo, induzida por estímulo com LPS, confirmando que o aumento de proteínas *O*-GlcNAc regula negativamente a ativação do NF-κB induzida por LPS.

Figura 29. *O*-GlcNAc inibe a translocação induzida por LPS da subunidade p65 do NF-κB para o núcleo. Macrófagos provenientes de medula óssea foram tratados com GlcN e ThG e estimulados com LPS, por 6 h. (A) imagem representativa da expressão da subunidade p65 do NF-κB na fração de proteínas nucleares; (B) gráfico de barras relativo à expressão da subunidade p65 normalizada pela expressão de histona H3 (marcador nuclear). Os resultados são expressos como média ± EPM (n=5). * $p < 0,05$ vs. grupo controle; # $p < 0,05$ vs. grupo LPS (ANOVA seguido pelo pós-teste de Newman Keuls).

Conclusões parciais 3

O aumento agudo de proteínas modificadas por *O*-GlcNAc:

- Diminui a expressão gênica da iNOS no leito mesentérico e os níveis sistêmicos de nitrito em animais com endotoxemia severa por LPS;
- Diminui a liberação e a expressão de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e TNF- α) em macrófagos estimulados com LPS;
- Reduz a translocação para o núcleo e ativação do fator de transcrição NF- κ B em macrófagos estimulados com LPS.

Considerando que os macrófagos são capazes de se distribuir pelos tecidos e podem fenotipicamente se diferenciar em duas principais subpopulações: macrófagos M1 (*ativados classicamente*) e macrófagos M2 (*ativados alternativamente*), os quais possuem funções diferentes durante a resposta imunológica, nossa próxima pergunta foi:

Quais os possíveis efeitos do aumento de proteínas O-GlcNAc no perfil de diferenciação e ativação de macrófagos?

5.7 Perfil de diferenciação e ativação dos macrófagos

5.7.1 Avaliação da viabilidade celular

A fim de verificar possíveis efeitos dos estímulos com GlcN, ThG e LPS na mortalidade das células tratadas, a viabilidade celular foi avaliada pelo método de redução do MTT. Nas concentrações e tempo (24 h) testados, não foi detectada citotoxicidade significativa com os estímulos analisados (figura 30).

Figura 30. Os compostos utilizados não alteram a viabilidade celular, verificada pelo método de redução do MTT. Porcentagem de viabilidade celular após estímulo de 24 h e diferentes concentrações das substâncias utilizadas durante o estudo ThG (A), GlcN (B) e LPS (C). Valores são expressos como média $\pm$ EPM de cada grupo experimental (n=6) e foram calculados em relação a 100% de células viáveis do controle (ANOVA de uma via com pós-teste de Newman-Keuls).

5.7.2 Avaliação do efeito do ThG e GlcN nos níveis de proteínas *O*-GlcNAc e enzimas da via da Hexosamina em macrófagos

Similar ao tratamento dos animais, avaliamos o melhor tempo de incubação para aumentos dos níveis totais de proteínas glicosiladas por *O*-GlcNAc em macrófagos. Inicialmente, macrófagos provenientes de medula óssea foram incubados com veículo (DMSO para ThG ou H₂O para GlcN), com ThG - 1 μ M (Figura 31 A) ou com GlcN - 5 mM (Figura 31 B) por diferentes períodos (30 min, 1, 3, 6, 12, 24 ou 48 h). As concentrações utilizadas já haviam sido pré-estabelecidas por outros estudos do laboratório (dados não demonstrados) e corroboradas por estudos da literatura.

Observamos que a incubação dos macrófagos com ThG e GlcN aumentou os níveis globais de proteínas *O*-GlcNAc de forma tempo-dependente. Conforme demonstrado na Figura 31, ocorreu aumento de proteínas *O*-GlcNAc após 12 e 24 h de incubação com ThG e em 6 e 12 h com GlcN.

Figura 31. ThG e GlcN promovem aumento tempo-dependente da expressão de proteínas *O*-GlcNAc em macrófagos. Os macrófagos foram estimulados em diferentes tempos. Acima, imagens representativas de *western blot* e, abaixo, gráfico de barras demonstrando a expressão total de proteínas *O*-GlcNAc em macrófagos estimulados com ThG (A) e GlcN (B) em comparação ao grupo controle. A expressão de proteínas *O*-GlcNAc foi normalizada pela expressão de β -actina. Os resultados representam a média $\pm$ EPM (n=4). * p <0.05 vs. grupo controle (ANOVA seguido pelo pós-teste de Newman Keuls).

Diante dos resultados obtidos e com o objetivo de avaliar os efeitos produzidos pelo aumento de proteínas modificadas por *O*-GlcNAc na polarização de macrófagos, foi escolhida a incubação por 24 h com ThG e de 12 h com GlcN para os experimentos futuros.

A fim de avaliar possível alteração das principais enzimas da VBH, responsável pelo aumento de proteínas modificadas por *O*-GlcNAc, verificamos que a estimulação de macrófagos com ThG aumentou a expressão da enzima OGA (Figura 32 A) e não alterou a expressão da enzima OGT (Figura 32 B).

Figura 32. Expressão das enzimas OGA e OGT em macrófagos estimulados com ThG e GlcN. Acima, imagens representativas de *western blot* e, abaixo, gráfico de barras demonstrando a expressão de OGA (A) e OGT (B), normalizada pela expressão de β-actina, em macrófagos estimulados com ThG (A) e GlcN (B). Os resultados representam a média ± EPM (n=4). * $p < 0.05$ vs. grupo controle. (ANOVA seguido pelo pós-teste de Newman Keuls).

5.7.3 Caracterização da diferenciação de macrófagos

No intuito de avaliar a expressão de marcadores na diferenciação de macrófagos em M0 (macrófagos não diferenciados), M1 e M2 procedemos à caracterização destas células por citometria de fluxo. Para avaliar os diferentes estados de diferenciação dos macrófagos (descrito nos Materiais e Métodos) foram utilizados os anticorpos F4/80 como marcador de macrófagos em geral, o TLR-2 para macrófago M1 e o receptor de manose (MR ou CD206) para macrófago M2. O anticorpo MR é considerado um marcador universal que é expresso em todos os subtipos de macrófagos M2 (M2a, M2b e M2c) (BISWAS; MANTOVANI, 2010). Desta forma, neste experimento não é possível avaliar os subgrupos de macrófagos M2.

Conforme detalhado na sessão dos Materiais e Métodos, para realizar a análise dos macrófagos, foi traçada uma janela nos *singlet*, baseando-se nos parâmetros de tamanho em altura e área para excluir os *doublets* (células agrupadas). Em seguida, as células da região R1 foram distribuídas segundo os parâmetros de complexidade (SSC) e tamanho (FSC- *forward side scatter*) e traçado uma janela específica para os macrófagos (R2), baseando-se na população celular. Finalmente, as células delimitadas pelas regiões R1 e R2 foram somadas e distribuídas num parâmetro de TLR-2+ ou iNOS+ por MR+. A população presente no quadrante direito inferior foi considerada macrófagos M1 (Figura 33 B), enquanto no quadrante esquerdo superior foi considerada macrófagos M2 (Figura 33 C).

Figura 33. Marcação de macrófagos M1 e M2 por citometria de fluxo. Porcentagem de células que expressam os marcadores TLR-2 e MR em *Dot plot*, distribuídas num parâmetro de TLR-2⁺ por MR⁺. Cada *Dot plot* representa um tipo de macrófago – M0, macrófagos não diferenciados (A), M1, LPS + IFN γ (B) e M2, IL-4 (C). Todas as células representadas são F4/80⁺.

Na figura a seguir (Figura 34), podemos avaliar o perfil de diferenciação de macrófagos isoladamente. Nos *Dot plot* A, B e C estão distribuídas a porcentagem de células com marcação MR⁺. Desta forma, em C verificamos que 75,3% do total de macrófagos possuem o receptor de manose na superfície celular, indicando que estas células ao serem incubadas com IL-4 passaram a expressar este receptor e, consequentemente, passaram a expressar o fenótipo de ativação alternativa M2. Em A e B, o percentual de células marcadas com MR praticamente inexistente, demonstrando mais uma vez que apenas macrófagos incubados com citocinas anti-inflamatórias apresentaram fenótipo M2. Já nos *Dot plot* D, E e F estão distribuídas a porcentagem de células com marcação TLR-2⁺ e o perfil visualizado difere completamente. Em D e E, 85,6 e 65,4%, respectivamente, dos macrófagos possuem marcação positiva para TLR-2.

Figura 34. Marcação de macrófagos M1 e M2 por citometria de fluxo. Porcentagem de células que expressam os marcadores MR e TLR-2 em *Dot plot*, distribuídas num parâmetro de F4/80⁺ por MR⁺ para M0 (A), M1 (B) e M2 (C) – uma marcação da ativação alternativa de macrófagos M2; F4/80⁺ por TLR-2⁺ para M0 (D), M1 (E) e M2 (F) – marcação da ativação clássica de macrófagos M1.

5.7.4 Avaliação do aumento de proteínas O-GlcNAc na polarização dos macrófagos

Uma vez que animais submetidos a endotoxemia por LPS apresentaram melhora na sobrevivência e no perfil inflamatório, nosso próximo objetivo foi avaliar um possível mecanismo pelos quais esse fenômeno ocorre. Deste modo, macrófagos provenientes de medula óssea foram incubados com ThG e GlcN e, após o período de incubação, foi realizada a polarização dos macrófagos para o perfil M1 ou M2. Como descrito nos métodos, para a diferenciação dos macrófagos em M1 e M2 foram adicionados ao meio os estímulos necessários para diferenciação celular, LPS e IFN γ para macrófagos M1 e IL-4 para macrófagos M2. Os macrófagos que não foram estimulados com citocinas foram denominados de macrófagos M0. Após transcorridos 48 h de polarização, os

macrófagos foram marcados com anticorpos específicos e analisados por citometria de fluxo.

Na Figura 35 A, os macrófagos não diferenciados ao serem estimulados com GlcN ou ThG que promovem aumento de proteínas *O*-GlcNAc, apresentam aumento da marcação para iNOS, um conhecido marcador de macrófagos M1, após as 48 h de incubação, conforme protocolo detalhado no item 4.1.2 dos materiais e métodos. Desta forma, verificamos neste experimento que a exposição crônica de macrófagos com *O*-GlcNAc pode estar associada ao fenótipo pró-inflamatório. Além disso, na Figura 35 B, podemos observar que em macrófagos que sofreram diferenciação para M1, com a adição de LPS e IFN- γ , também apresentam aumento do marcador para iNOS.

Em macrófagos polarizados para o fenótipo M2, ocorreu diminuição da marcação para o receptor MR, conhecido marcador de macrófagos M2, em presença de GlcN e ThG (Figura 36 B). Porém, em macrófagos M0 este mesmo perfil de diferenciação não foi observado (Figura 36 A).

Estes dados nos sugerem que o aumento crônico de proteínas modificadas por *O*-GlcNAc promove perfil de ativação pró-inflamatório nos macrófagos, em contradição com os efeitos até então observados para o aumento agudo de glicosilação em animais tratados com GlcN e ThG.

Figura 35. Macrófagos estimulados com ThG e GlcN apresentam maior marcação para iNOS, marcador de macrófagos M1. Porcentagem de células que expressam o marcador de iNOS, marcação da ativação clássica de macrófagos M1, em macrófagos não diferenciados (A) e diferenciados para M1 (B). Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM (n=5). *p< 0,05 vs. grupo controle (coluna branca) (ANOVA seguido pelo pós-teste de Newman Keuls).

Figura 36. Macrófagos estimulados com ThG e GlcN apresentam redução da marcação do receptor MR, marcador de macrófagos M2. Porcentagem de células que expressam o marcador de MR, marcação da ativação de macrófagos M2, em macrófagos não diferenciados (A) e diferenciados para M2 (B). Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM (n=5). *p< 0,05 vs. grupo controle (coluna branca) (ANOVA seguido pelo pós-teste de Newman Keuls).

Conclusões parciais 4

O aumento de proteínas modificadas por *O*-GlcNAc:

- Promove aumento de IL-1 β tanto em macrófagos não diferenciados quanto em macrófagos diferenciados para M1 após tratamento crônico;
- Promove aumento do marcador específico de macrófagos pró-inflamatórios (iNOS), tanto em macrófagos M0 quanto M1;
- Diminui a polarização para macrófagos anti-inflamatórios (M2);
- Promove perfil de ativação pró-inflamatório nos macrófagos em fase de diferenciação / polarização.

Discussão

6 DISCUSSÃO

Os principais resultados obtidos neste trabalho demonstraram que os tratamentos com GlcN e ThG aumentaram a sobrevivência dos animais com endotoxemia. Este fato poderia ser explicado em função dos tratamentos com GlcN e ThG terem reduzido os níveis sistêmicos a expressão de IL-1 β , IL-6 e TNF- α em aorta e leito mesentérico de animais com endotoxemia. O tratamento com GlcN atenuou, mas não normalizou a hipotensão arterial causada pela endotoxemia por LPS. Não foram observadas alterações de reatividade na artéria aorta de animais que receberam LPS, ou LPS + GlcN. Entretanto, os tratamentos com GlcN e ThG atenuaram a redução da resposta a vasoconstritores observada em artéria mesentérica de resistência de animais que receberam LPS. Estes resultados podem ser em parte decorrentes da diminuição da expressão do mRNA da iNOS no leito mesentérico e dos níveis sistêmicos de nitrito nos animais tratados. O aumento dos níveis de proteínas glicosiladas, com GlcN e ThG, em cultura de macrófagos provenientes da medula óssea de camundongos corroboram os resultados descritos acima. O tratamento diminuiu a liberação e a expressão de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e TNF- α) e reduziu a atividade do NF- κ B e sua translocação para o núcleo pela marcação da subunidade p65 em macrófagos estimulados com LPS.

A modificação pós-traducional de proteínas pela *O*-Glicosilação com *N*-acetilglucosamina (*O*-GlcNAc), em resíduos de serina ou treonina, é um processo altamente dinâmico que modula diversas vias de sinalização, sendo uma forma inovadora de considerar as formas de sinalização celular em condições tanto fisiológicas quanto patológicas.

Os níveis de proteínas modificadas por *O*-GlcNAc podem ser manipulados de diversas formas, como pela hiperexpressão ou supressão da expressão das enzimas da via de biossíntese da hexosamina (VBH), bem como pela inibição farmacológica dessas

enzimas (OGA, OGT e GFAT). Uma outra maneira de aumentar proteínas glicosiladas é o tratamento com glucosamina ou glicose, que atuam como substratos da VBH, aumentando os níveis globais de proteína *O*-GlcNAc.

O tratamento com glucosamina, um açúcar natural sintetizado a partir da glicose na VBH (MARSHALL; BACOTE; TRAXINGER, 1991), tem como vantagem o fato da glucosamina ser facilmente produzida comercialmente, o que torna o tratamento economicamente acessível. Entretanto, a glucosamina não aumenta seletivamente proteínas *O*-GlcNAc, uma vez que pode ser utilizada em outros tipos de glicosilação.

Para tornar nosso estudo mais rigoroso, optamos também pelo uso do inibidor potente e seletivo da OGA (Thiamet G, ThG), com constante de inibição (K_i) de 21nM. A remoção do açúcar de resíduos de Ser/Ter das proteínas glicosiladas é controlada diretamente pela atividade da OGA. Desta forma, a inibição da enzima OGA representa uma ferramenta útil e altamente seletiva no estudo dos efeitos de *O*-GlcNAc, uma vez que a inibição da enzima promove aumento de proteínas *O*-GlcNAc (NGOH et al., 2010).

Atualmente, a sepse é vista como uma doença que ocorre com a ativação de ambas as respostas, tanto pró-inflamatórias quanto anti-inflamatórias e, além dessas, são observadas modificações de grande impacto em, praticamente, todos os outros sistemas que compõem o organismo. Fatores relacionados à heterogeneidade individual como idade, comorbidades, lesões, uso de medicamentos e foco primário da infecção, também acrescentam complexidade à sepse (SINGER et al., 2016).

Apesar dos avanços alcançados, devido às complexas interações dos sistemas em um organismo com sepse, muitos mecanismos permanecem desconhecidos. Nesse contexto, modelos animais têm sido importantes ferramentas no estudo da doença e no desenvolvimento de novas propostas terapêuticas.

Durante o quadro de sepse ocorre uma resposta inflamatória sistêmica complexa, desencadeada por uma infecção, na maior parte das vezes causada por bactérias. Essa reação é a forma que o organismo encontra para combater o micro-organismo agressor. Para tanto, o sistema de defesa libera mediadores químicos, elevando principalmente os níveis de citocinas circulantes (de duas a cem vezes superior aos controles saudáveis) (BOUTAGY et al., 2016). Essa elevação em massa de citocinas pró-inflamatórias, pode levar à lesões celulares, alteração na coagulação do sangue, queda da pressão arterial e, potencialmente, evoluir para o choque séptico, que se caracteriza por grave falha circulatória associada à vasodilatação sistêmica, vasoplegia, hiporesponsividade a vasoconstritores e hipoperfusão de órgãos vitais que levam à disfunção de múltiplos órgãos. A diminuição do fluxo sanguíneo para o leito vascular mesentérico, o aumento da resistência vascular e a diminuição da capacidade de resposta a agentes vasoconstritores aplicados exogenamente estão relacionados com a hipoperfusão e falência de múltiplos órgãos (Ozer, 2017).

Os efeitos produzidos pelo aumento de *O*-GlcNAc no sistema cardiovascular são bastante distintos quando se consideram os processos vasculares e cardíacos. Os efeitos agudos produzidos pelo aumento transitório da produção de *O*-GlcNAc estão associados a uma melhora na função cardíaca, com redução da produção de citocinas inflamatórias; redução da geração de EROs e diminuição da formação de poros de permeabilidade transicional mitocondrial (PPTm); além de aumentar a sobrevivência de células cardíacas após condições de estresse agudo na isquemia-reperfusão e trauma hemorrágico, enquanto a inibição da produção de *O*-GlcNAc diminuiu a sobrevivência das células miocárdicas (CHATHAM et al., 2007; JONES et al., 2008; NGOH et al., 2010; LIMA et al., 2012). Entretanto, condições crônicas de aumento de proteínas *O*-GlcNAc estão associadas a efeitos negativos no coração. No sistema vascular, o aumento de *O*-GlcNAc

contribui para aumento da resposta a estímulos contráteis, mediando os efeitos dos agentes vasoativos como ET-1 e aumentando a ativação da via RhoA/Rho quinase (LIMA et al., 2011a). Estes efeitos de *O*-GlcNAc na vasculatura podem ser vistos como negativos no caso de doenças cardiovasculares como hipertensão arterial. Entretanto, são efeitos interessantes ou potencialmente positivos em outras patologias, como a sepse.

Considerando que na sepse ocorre vasodilatação sistêmica, hiporesponsividade a vasoconstritores e hipoperfusão de órgãos vitais que levam à disfunção de múltiplos órgãos (Ozer, 2017), a possível reversão deste quadro pelo aumento de proteínas modificadas por *O*-GlcNAc é de interesse. A modificação por *O*-GlcNAc poderia ser vista como um sinal intracelular que determina como uma célula responde a estímulos extracelulares na tentativa de bloquear eventos que contribuam para a instalação do quadro de sepse.

Uma vez que a sepse produz uma resposta inflamatória complexa devido a uma infecção bacteriana e os eventos iniciais envolvem a liberação de células inflamatórias, aumento dos níveis de citocinas e aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, verificamos neste trabalho, utilizando como modelo experimental animais com sepse induzida pela administração de LPS (denominada como endotoxemia por LPS), que os tratamentos com GlcN ou ThG reduzem o recrutamento para o pulmão e a migração para a cavidade abdominal de células responsáveis pelo início do processo inflamatório, quando comparados aos animais que receberam apenas veículo.

Acredita-se que o início e a progressão da sepse sejam causados pelo descontrole das células do sistema imune inato como macrófagos, neutrófilos e células dendríticas, com uma maciça e exacerbada ativação dessas células inflamatórias resultando numa anarquia metabólica, na qual “o próprio organismo não consegue controlar o que ele próprio criou” (BONE et al., 1992; VERONESI, 1996). Com isso, ao avaliarmos um

menor número de células inflamatórias no modelo utilizado em nosso estudo, nosso próximo passo foi analisar a liberação de citocinas características dessas células.

De fato, ocorreu menor secreção de citocinas pró-inflamatórias pelas células inflamatórias nos animais tratados com GlcN e ThG e com endotoxemia por LPS, tanto a nível sistêmico quanto tecidual, pois analisamos a liberação de citocinas no soro e a expressão em artérias aorta e mesentéricas. Dentre os mediadores pró-inflamatórios, destacam-se TNF- α e as interleucinas IL-1 β , a IL-8 e a IL-6. As altas concentrações de mediadores pró-inflamatórios na circulação são os responsáveis pela maioria das alterações fisiopatológicas como, lesões teciduais e disfunção de órgãos, observadas tanto em pacientes como em modelos experimentais de sepse (DINARELLO, 1997).

No trabalho de Hwang e colaboradores, o efeito neuroprotetor da GlcN foi avaliado em modelo de oclusão da artéria cerebral de ratos. A GlcN proporcionou redução da deficiência motora e déficit neurológico e os efeitos anti-inflamatórios foram atribuídos principalmente a capacidade de reduzir a liberação de iNOS, COX- 2, IL-1 β e IL-6 e inibir o fator nuclear NF- κ B tanto *in vivo* quanto em células da micróglia BV2 (HWANG et al., 2010).

A complexa interação entre a resposta inflamatória exacerbada e as alterações hemodinâmicas contribuem para o agravamento no quadro da sepse. Considerando que uma das disfunções orgânicas mais comum é a queda da pressão arterial (efeito cardiovascular), a terapia farmacológica vigente busca a manutenção da pressão arterial e do débito cardíaco com reposição de líquido e agentes inotrópicos e vasopressores (HOLLENBERG et al., 2004). Com isso, a busca por novos agentes faz-se necessária, uma vez que uma grande parcela dos pacientes não respondem ao tratamento. Ao avaliarmos a pressão arterial média (PAM) dos animais submetidos a endotoxemia verificamos que embora a PAM não tenha sido normalizada, após 6 h da indução da

endotoxemia por LPS, o tratamento com GlcN atenuou a queda da pressão quando comparado ao grupo que recebeu somente LPS.

Foi observado que os animais endotóxicos tratados com GlcN e ThG apresentaram aumento de aproximadamente 50 % e 60 % na sobrevida, respectivamente. Em conjunto, os dados indicam que o aumento agudo nos níveis de proteínas glicosiladas, atenuando a hipotensão arterial e melhorando a sobrevida dos animais tratados, pode estar diretamente relacionado à redução na liberação de mediadores inflamatórios e de seus efeitos no sistema cardiovascular.

Os estudos de reatividade vascular, utilizando aorta dos animais dos grupos estudados, demonstraram que a endotoxemia por LPS não modificou as respostas vasculares a fenilefrina (PE), agonista de alfa-adrenoceptores, e acetilcolina (ACh), vasodilatador dependente de endotélio. Esses dados corroboram dados da literatura onde somente 15 h após a indução de endotoxemia por LPS, em modelo experimental de camundongos, foram observadas alterações na resposta vascular a PE e ACh (CHAUHAN, 2003). Este mesmo estudo demonstrou que a expressão de iNOS, 4 h após a indução da endotoxemia, não está alterada na aorta desses animais e os autores concluem que a endotoxemia provoca respostas vasculares em tempos diferentes e dependentes do leito vascular.

Durante a sepse um dos primeiros sinais é a queda da pressão arterial e há uma falta de resposta aos vasoconstritores (RODRIGUES; FRACASSO, 2007). Considerando dados do laboratório descritos por Lima e colaboradores, onde o uso de PugNAc (inibidor da OGA) em aorta de ratos aumenta o nível de proteínas *O*-GlcNAc, ocasionando aumento da resposta contrátil para PE e serotonina, nosso próximo passo no trabalho foi avaliar em ramos da artéria mesentérica se o tratamento de animais com endotoxemia promove melhora da hiporeatividade vascular, uma vez que nossos dados indicam uma

melhora da pressão arterial e sobrevida dos animais tratados. Lima et al. também descreveram que o aumento de *O*-GlcNAc está associado a aumento de contratilidade vascular observado na hipertensão DOCA-sal e após infusão crônica de ET-1 em aorta de ratos (LIMA et al., 2008, 2009b, 2010).

No presente estudo demonstramos que os tratamentos com GlcN e ThG atenuam a hiporeatividade a vasoconstritores (em artérias mesentéricas de resistência) observada em animais que receberam LPS. Nossos resultados mostraram aumento da vasoconstrição induzida por PE e melhora da vasodilatação induzida por ACh, após 6 h de indução de endotoxemia, nos animais tratados com GlcN e ThG, sugerindo que o aumento de proteínas modificadas por *O*-GlcNAc promove alterações vasculares nesses animais.

Estes resultados também vão ao encontro do aumento de sobrevida dos animais com endotoxemia submetidos ao tratamento com GlcN e ThG e, conseqüentemente, que apresentaram aumento de proteínas modificadas por *O*-GlcNAc, uma vez que o LPS é capaz de ativar as células endoteliais, induzindo a produção de citocinas - levando ao recrutamento e ativação de leucócitos, com perda da função de barreira - permitindo maior passagem de fluidos e células, além da ativação de genes da enzima iNOS – responsável pela produção de NO, principal responsável pela perda do tônus vascular em casos de sepse.

Estudos prévios mostram que o TNF- α pode induzir a expressão de iNOS pela via de sinalização do NF- κ B. Xing e colaboradores demonstraram que o aumento dos níveis de proteínas glicosiladas inibe respostas inflamatórias induzidas pelo TNF- α por inibir a porção fosforilada p65 (Ser 536) do NF- κ B e, conseqüentemente, aumenta a interação da porção p65 do NF- κ B ao I κ B- α , diminuindo, desse modo, a ativação da via de sinalização de NF- κ B (XING et al., 2011).

A expressão da iNOS, induzida no endotélio vascular e nas células de músculo liso por algumas citocinas, tais como IL-1 β , IL-6, TNF- α e IFN- γ , resulta na produção demasiada de NO por longos períodos, mantendo a vasodilatação e a resistência a vasoconstritores, fator principal que medeia as alterações no sistema vascular (TITHERADGE, 1999).

Durante a endotoxemia, o NO é produzido em grande quantidade pela iNOS, expressa em leucócitos presentes no processo inflamatório e estimulados por citocinas (CUNHA et al., 1999). Existem evidências que o NO participa da vasodilatação associada à hipotensão arterial (WOLKOW, 1998), refratariedade às catecolaminas vasopressoras (SILVA-SANTOS; ASSREUY, 1999) e lesão em órgãos-alvo (EVANS; STEFANOVIC-RACIC, 1996). Estas alterações podem ser prevenidas pelo tratamento com glicocorticoides. Por exemplo, a dexametasona inibe a expressão da iNOS pelo receptor de glicocorticoide ativado, impedindo a ligação do NF- κ B ao promotor da óxido nítrico sintase induzida, evitando assim a sua transcrição. Neste trabalho, os autores verificaram que o bloqueio da ativação do NF- κ B e a expressão da iNOS pela dexametasona melhora a hipotensão, a resposta aos agentes vasoconstritores e a disfunção de múltiplos órgãos (hipoglicemia, lesão hepática e pancreática) de ratos com endotoxemia induzida por LPS (RUETTEN; THIEMERMANN, 1997). Em um estudo recente, Al-Harbi e colaboradores (AL-HARBI et al., 2016) demonstraram a potente ação anti-inflamatória da dexametasona sobre a lesão pulmonar aguda induzida por LPS em camundongo. Este estudo demonstrou que os animais pré-tratados com dexametasona apresentaram diminuição dos níveis e expressão de IL-6, TNF- α , COX-2, iNOS, NF- κ B e atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) e aumento da citocina anti-inflamatória IL-10, bem como diminuição das lesões pulmonares, em relação ao grupo LPS.

Considerando o aumento de NO na sepse - já amplamente descrito -, é possível que a melhora na função vascular e na sobrevida observada nos animais tratados com GlcN e ThG esteja relacionada à modulação da expressão de iNOS e liberação de NO, uma vez que o tratamento com *O*-GlcNAc reduz a expressão da iNOS em leito vascular mesentérico e os níveis sistêmicos de nitrito no soro.

O modelo de ligação e perfuração do ceco (CLP, do inglês *cecum ligation and puncture*) é considerado padrão ouro entre os modelos utilizados, pois reproduz muitas alterações fisiopatológicas, bem como o curso de progressão da sepse observado em humanos (LILLEY et al., 2015). Esse modelo consiste em romper a barreira intestinal endógena, permitindo a liberação gradual de patógenos da microbiota na cavidade peritoneal, onde induzirão uma infecção polimicrobiana. Caso a infecção local não seja controlada, a carga bacteriana aumenta e os patógenos são translocados para a corrente sanguínea, provocando uma resposta inflamatória sistêmica (DEJAGER et al., 2011). Em relação ao modelo experimental de CLP, observamos que o tratamento com GlcN melhora a sobrevida dos animais, com aumento da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal e um menor sequestro de neutrófilos no pulmão, reduzindo desta forma o recrutamento em massa para tecidos alvos de células responsáveis pelo início do processo inflamatório. Em conjunto, os dados apontam para melhora do quadro de sepse polimicrobiana em animais submetidos à CLP e tratados com GlcN.

O trabalho de Singleton (SINGLETON; WISCHMEYER, 2008) demonstrou pela primeira vez que o tratamento com glutamina seguido pela indução de sepse experimental pelo modelo de CLP leva ao aumento da glicosilação por *O*-GlcNAc de proteínas como *heat shock fator-1* (HSF-1) e Sp1, principais promotores para a resposta ao estresse de proteínas denominadas como *heat shock proteins* (HSPs). As HSPs são proteínas que estão relacionadas a diversos processos celulares e a indução de HSPs podem

proporcionar significativa proteção contra muitas formas de lesão celular, incluindo isquemia e reperfusão, lesão pulmonar e sepse.

Durante o quadro de sepse, ocorre uma intensa disfunção cardíaca, causada em parte por prejuízo da função mitocondrial, limitando a capacidade das células de produzir adenosina trifosfato (ATP). Foi demonstrado que o tratamento com glutamina melhora a função cardíaca em parte pela restauração da atividade do citocromo c oxidase e consequente melhora da função mitocondrial. Esses achados sugeriram que a intervenção terapêutica com glutamina pode beneficiar pacientes com depressão miocárdica associada a sepse (GROENING et al., 2011).

A avaliação conjunta dos resultados, utilizando dois modelos experimentais (endotoxemia por LPS e CLP), dois compostos que aumentam a quantidade de proteínas modificadas por *O*-GlcNAc - glucosamina (GlcN) e Thiamet-G (ThG), bem como protocolos que permitem análise da função cardiovascular e ativação do sistema imune, indicam que a modulação da modificação pós-traducional por *O*-GlcNAc pode representar nova estratégia terapêutica em condições de resposta inflamatória sistêmica, podendo reduzir o processo inflamatório e atenuar os eventos cardiovasculares associados a endotoxemia.

Estes resultados abrem também novas perspectivas, uma vez que a inflamação desempenha um importante papel fisiopatológico no desenvolvimento e progressão da aterosclerose, hipertensão, diabetes e outras condições associadas a danos vasculares.

Os macrófagos são células do sistema imune com a capacidade de secretar diversas citocinas, moléculas de adesão e fatores de crescimento, que dentre inúmeros papéis podem influenciar a inflamação vascular. O envolvimento dos macrófagos em lesões vasculares foi descrito em animais que possuem comprometimento na imunidade inata, camundongos chamados osteopetróticos (Op/Op). Estes camundongos possuem uma

mutação no gene do *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF), levando a uma deficiência de macrófagos. Em animais Op/Op que receberam infusão crônica de angiotensina II a elevação da pressão arterial, estresse oxidativo, disfunção endotelial e o remodelamento vascular foram abolidos quando comparados ao grupo controle, demonstrando que animais deficientes da linhagem de monócitos/macrófagos e mediadores pró-inflamatórios são protegidos dos efeitos vasculares da angiotensina II (DE CIUCEIS et al., 2005).

As citocinas mais bem caracterizadas como envolvidas na disfunção vascular e em algumas doenças arteriais inflamatórias são TNF- α e as interleucinas IL-1 β e IL-6, sendo capazes de desencadear vias críticas que regulam estas doenças (CARBONE; MONTECUCCO, 2015). O TNF- α , uma citocina pró-inflamatória, é um dos primeiros mediadores liberados por macrófagos na resposta inflamatória. Além disso, também pode atrair várias células de defesa para os sítios de infecção, levando a produção de outros mediadores, como as interleucinas IL-1 β , IL-6 e IL-8; derivados dos lipídios, como as prostaglandinas e também a produção de radicais livres (FLOHÉ et al., 1991; CARBONE; MONTECUCCO, 2015). O TNF- α afeta a biodisponibilidade do NO pelo aumento da atividade da NADPH oxidase e redução da eNOS. O TNF- α e IL-1 β atuam como mediadores das interações endotélio-leucócitos, aumentando a expressão superficial de E-selectina, moléculas de adesão células vasculares e intercelulares (VCAM-1 e ICAM-1). Bem como modulam alterações estruturais, permitindo aumento da permeabilidade vascular, através da ativação da via da MAPK e proteína quinase C (PKC) (CARBONE; MONTECUCCO, 2015). Estudo realizado por De Salvatore e colaboradores (DE SALVATORE et al., 2003) demonstraram que o tratamento crônico in vivo com IL-6 e IL-1 β prejudica o relaxamento induzido pela ACh em artérias mesentéricas. Além disso, a incubação destes vasos com IL-1 β e TNF- α prejudica o

relaxamento mediado pela ACh. Este efeito foi parcialmente atribuído ao aumento na geração de EROs no endotélio e músculo liso de artérias mesentéricas com consequente inativação do NO (JIMÉNEZ-ALTAYÓ et al., 2006).

Os efeitos relatados acima podem ser descritos, em parte, pela liberação de diversos mediadores inflamatórios pelos macrófagos, uma vez que o aumento da produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , IL-6 e TNF- α e também a isoforma induzida da enzima óxido nítrico sintase em macrófagos é muito bem documentada. Nossos resultados *in vitro* confirmaram o envolvimento do aumento de proteínas glicosiladas na redução da liberação de citocinas pró-inflamatórias na resposta inflamatória ao LPS em macrófagos. E um dos principais mecanismos envolvidos está a inibição da translocação da p65 para o núcleo, confirmando que o aumento de proteínas O-GlcNAc regula negativamente a ativação do NF- κ B induzida por LPS, avaliado tanto pelo ensaio da atividade da luciferase em macrófagos RAW-Luc quanto pela translocação do NF- κ B para o núcleo por *western blot* pela marcação da subunidade p65 (Figura 37).

Figura 37. Representação esquemática dos achados deste trabalho. O aumento de proteínas modificadas por *O*-GlcNAc reduz os níveis sistêmicos de citocinas pró-inflamatórias, bem como a ativação do fator de transcrição NF- κ B, reduzindo o processo inflamatório e disfunção vascular em animais com endotoxemia.

Conclusão

7 CONCLUSÃO

O conjunto de resultados nos permite concluir que o tratamento agudo com GlcN e ThG aumenta os níveis de *O*-GlcNAc e também a sobrevida em animais com endotoxemia induzida por LPS. O tratamento agudo com GlcN também aumenta a sobrevida de animais submetidos a cirurgia de CLP.

O aumento na sobrevida desses animais tratados está associado à redução do sequestro de neutrófilos pelo pulmão, da liberação de mediadores inflamatórios, tanto sistêmica como localmente (aorta e ramos da artéria mesentérica), e à atenuação da hipotensão arterial e refratariedade vascular a estímulos constritores, características do modelo de endotoxemia por LPS.

Os mecanismos pelos quais o aumento de proteínas glicosiladas produz esses efeitos descritos estão relacionados a glicosilação da subunidade p65 do NF- κ B, o que promove diminuição da ativação deste fator de transcrição e consequentemente uma menor produção de mediadores inflamatórios.

Referências

8 REFERÊNCIAS

- AL-HARBI, N. O.; IMAM, F.; AL-HARBI, M. M.; ANSARI, M. A.; ZOHEIR, K. M. A.; KORASHY, H. M.; SAYED-AHMED, M. M.; ATTIA, S. M.; SHABANAH, O. A.; AHMAD, S. F. Dexamethasone Attenuates LPS-induced Acute Lung Injury through Inhibition of NF- κ B, COX-2, and Pro-inflammatory Mediators. **Immunological Investigations**, v. 45, n. 4, p. 349–369, 2016.
- ALVES-FILHO, J. C.; SÔNEGO, F.; SOUTO, F. O.; FREITAS, A.; VERRI, W. a; AUXILIADORA-MARTINS, M.; BASILE-FILHO, A.; MCKENZIE, A. N.; XU, D.; CUNHA, F. Q.; LIEW, F. Y. Interleukin-33 attenuates sepsis by enhancing neutrophil influx to the site of infection. **Nature medicine**, v. 16, n. 6, p. 708–712, 2010.
- AO, L.; SONG, Y.; FULLERTON, D. A.; DINARELLO, C. A.; MENG, X. The interaction between myocardial depressant factors in endotoxemic cardiac dysfunction: Role of TNF- α in TLR4-mediated ICAM-1 expression. **Cytokine**, v. 38, n. 3, p. 124–129, 2007.
- BARRETO, M. F. C.; DELLAROZA, M. S. G.; KERBAUY, G.; GRION, C. M. C. Sepsis in a university hospital: a prospective study for the cost analysis of patients' hospitalization. **Journal of School of Nursing - USP**, v. 50, n. 2, p. 299–305, 2016.
- BISWAS, S. K.; MANTOVANI, A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets : cancer as a paradigm. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 10, p. 889–896, 2010.
- BONE, R. C.; SIBBALD, W. J.; SPRUNG, C. L. The ACCP-SCCM consensus conference on sepsis and organ failure. **Chest**, v. 101, n. 6, p. 1481–1483, 1992. D
- BOUTAGY, N. E.; MCMILLAN, R. P.; FRISARD, M. I.; HULVER, M. W. Metabolic endotoxemia with obesity: Is it real and is it relevant? **Biochimie**, v. 124, p. 11–20, 2016.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.
- CARBONE, F.; MONTECUCCO, F. Inflammation in arterial diseases. **IUBMB Life**, v. 67, n. 1, p. 18–28, 2015.
- CHATHAM, J. C.; NÖT, L. G.; FÜLÖP, N.; MARCHASE, R. B. Hexosamine Biosynthesis and Protein O-Glycosylation. **Shock**, v. 29, n. 4, p. 1, 2007.
- CHAUHAN, S. D. Protection against lipopolysaccharide-induced endothelial dysfunction in resistance and conduit vasculature of iNOS knockout mice. **The FASEB Journal**, 5 fev. 2003.
- COHEN, J. The immunopathogenesis of sepsis. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 885–891, 2002.
- COOPER, Z. a; GHOSH, A.; GUPTA, A.; MAITY, T.; BENJAMIN, I. J.; VOGEL, S. N.; HASDAY, J. D.; SINGH, I. S. Febrile-range temperature modifies cytokine gene expression in LPS-stimulated macrophages by differentially modifying NF- κ B recruitment to cytokine gene promoters. **American journal of physiology. Cell physiology**, v. 298, n. 1, p. C171–C181, 2010.
- CUNHA, F. Q.; POOLE, S.; LORENZETTI, B. B.; FERREIRA, S. H. Cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia limited by interleukin-4. **British Journal of Pharmacology**, v. 126, p. 45–50, 1999.

DAVIES, M. J. Myeloperoxidase-derived oxidation: mechanisms of biological damage and its prevention. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 48, n. 1, p. 8–19, 2011.

DE CIUCEIS, C.; AMIRI, F.; BRASSARD, P.; ENDEMANN, D. H.; TOUYZ, R. M.; SCHIFFRIN, E. L. Reduced vascular remodeling, endothelial dysfunction, and oxidative stress in resistance arteries of angiotensin II-infused macrophage colony-stimulating factor-deficient mice: Evidence for a role in inflammation in angiotensin-induced vascular injury. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 25, n. 10, p. 2106–2113, 2005.

DE SALVATORE, G.; DE SALVIA, M. a; PIEPOLI, a L.; NATALE, L.; PORRO, C.; NACCI, C.; MITOLO, C. I.; MITOLO-CHIEPPA, D. Effects of in vivo treatment with interleukins 1beta and 6 on rat mesenteric vascular bed reactivity. **Autonomic & autacoid pharmacology**, v. 23, n. 2, p. 125–131, 2003.

DEJAGER, L.; PINHEIRO, I.; DEJONCKHEERE, E.; LIBERT, C. Cecal ligation and puncture: The gold standard model for polymicrobial sepsis? **Trends in Microbiology**, v. 19, n. 4, p. 198–208, 2011.

DINARELLO, C. A. Proinflammatory and Anti-inflammatory Cytokines as Mediators in the Pathogenesis of Septic Shock. **Chest**, v. 112, n. 6, p. 321S–329S, 1997.

EVANS, C. H.; STEFANOVIC-RACIC, M. Nitric oxide in arthritis. **Methods**, v. 10, p. 38–42, 1996.

FARIAS BENJAMIM, C.; SANTANA SILVA, J.; BRUNO FORTES, Z.; APARECIDA OLIVEIRA, M.; HENRIQUE FERREIRA, S.; QUEIROZ CUNHA, F. Inhibition of leukocyte rolling by nitric oxide during sepsis leads to reduced migration of active microbicidal neutrophils. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 7, p. 3602–3610, 2002.

FLEISCHMANN, C.; SCHERAG, A.; ADHIKARI, N. K. J.; HARTOG, C. S.; TSAGANOS, T.; SCHLATTMANN, P.; ANGUS, D. C.; REINHART, K. Assessment of Global Incidence and Mortality of Hospital-treated sepsis - current estimates and limitations. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 193, n. 3, p. 259–272, 2016.

FLOHÉ, S.; HEINRICH, P. C.; SCHNEIDER, J.; WENDEL, A.; FLOHÉ, L. Time course of IL-6 and TNF-α release during endotoxin-induced endotoxin tolerance in rats. **Biochemical Pharmacology**, v. 41, n. 11, p. 1607–1614, 1991.

FUJIWARA, N.; KOBAYASHI, K. Macrophages in inflammation. **Current Drug Targets - Inflammation & Allergytargets - Inflammation & Allergy**, v. 4, n. 3, p. 281–286, 2005.

GORDON, S.; TAYLOR, P. R. Monocyte and macrophage heterogeneity. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, n. 12, p. 953–964, 2005.

GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, n. 1, p. 131–138, 1982.

GROENING, P.; HUANG, Z.; EF, L. G.; RJ, L. Glutamine restores myocardial cytochrome C oxidase activity and improves cardiac function during experimental sepsis. **JPEN Journal of Parenteral & Enteral Nutrition**, v. 35, n. 2, p. 249–254 6p, 2011.

HAEGENS, A.; VERNOOY, J. H. J.; HEERINGA, P.; MOSSMAN, B. T.; WOUTERS, E. F. M. Myeloperoxidase modulates lung epithelial responses to pro-inflammatory agents. **European Respiratory Journal**, v. 31, n. 2, p. 252–260, 2008.

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. 1–35, 2010.

HART, G. W.; HOUSLEY, M. P.; SLAWSON, C. Cycling of O-linked β -N-acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins. **Nature**, v. 446, n. April, p. 1017–1022, 2007.

HENKIN, C. S.; COELHO, J. C.; PAGANLLA, M. C.; SIQUEIRA, R. M.; DIAS, F. S. Sepsis : uma visão atual. **Scientia Medica**, v. 19, n. 3, p. 135–145, 2009.

HOLLENBERG, S. M.; AHRENS, T. S.; ANNANE, D.; ASTIZ, M. E.; CHALFIN, D. B.; DASTA, J. F.; HEARD, S. O.; MARTIN, C.; NAPOLITANO, L. M.; SUSLA, G. M.; TOTARO, R.; VINCENT, J.-L.; ZANOTTI-CAVAZZONI, S. Practice parameters for hemodynamic support of sepsis in adult patients: 2004 update. **Critical Care Medicine**, v. 32, n. 9, p. 1928–1948, 2004.

HOTCHKISS, R. S.; MOLDAWER, L. L.; OPAL, S. M.; REINHART, K.; TURNBULL, I. R.; VINCENT, J.-L. Sepsis and septic shock. **Nature Reviews, Disease Primers**, v. 2, n. June, p. 1–21, 2016.

HUBBARD, W. J.; CHOUDHRY, M.; SCHWACHA, M. G.; KERBY, J. D.; RUE, L. W.; BLAND, K. I.; CHAUDRY, I. H. CECAL LIGATION AND PUNCTURE. **Shock**, v. 24, p. 52–57, dez. 2005.

HWANG, S. Y.; SHIN, J. H.; HWANG, J. S.; KIM, S. Y.; SHIN, J. A.; OH, E. S.; OH, S.; KIM, J. Bin; LEE, J. K.; HAN, I. O. Glucosamine exerts a neuroprotective effect via suppression of inflammation in rat brain ischemia/reperfusion injury. **Glia**, v. 58, n. 15, p. 1881–1892, 2010.

ILAS. **Instituto Latino Americano de Sepsis**. Disponível em: <http://www.ilas.org.br/>

JIMÉNEZ-ALTAYÓ, F.; BRIONES, A. M.; GIRALDO, J.; PLANAS, A. M.; SALAICES, M.; VILA, E. Increased Superoxide Anion Production by Interleukin-1 beta Impairs Nitric Oxide-Mediated Relaxation in Resistance Arteries. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 316, n. 1, p. 42–52, 2006.

JONES, S. P.; ZACHARA, N. E.; NGOH, G. A.; HILL, B. G.; TESHIMA, Y.; BHATNAGAR, A.; HART, G. W.; MARBÁN, E. Cardioprotection by N-acetylglucosamine linkage to cellular proteins. **Circulation**, v. 117, n. 9, p. 1172–1182, 2008.

KIM, D. H.; SEOK, Y. M.; KIM, I. K.; LEE, I. K.; JEONG, S. Y.; JEOUNG, N. H. Glucosamine increases vascular contraction through activation of RhoA/Rho kinase pathway in isolated rat aorta. **BMB Reports**, v. 44, n. 6, p. 415–420, 2011.

KNEASS, Z. T.; MARCHASE, R. B. Neutrophils exhibit rapid agonist-induced increases in protein-associated O-GlcNAc. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 44, p. 45759–45765, 2004.

KUROWSKA-STOLARSKA, M.; KEWIN, P.; MURPHY, G.; RUSSO, R. C.; STOLARSKI, B.; GARCIA, C. C.; KOMAI-KOMA, M.; PITMAN, N.; LI, Y.; NIEDBALA, W.; MCKENZIE, A. N.; TEIXEIRA, M. M.; LIEW, F. Y.; XU, D. IL-33 induces antigen-specific IL-5+ T cells and promotes allergic-induced airway inflammation independent of IL-4. **J Immunol**, v. 181, n. 7, p. 4780–4790, 2008.

LACZY, B.; HILL, B. G.; WANG, K.; PATERSON, A. J.; WHITE, C. R.; XING, D.; CHEN, Y.-F.; DARLEY-USMAR, V.; OPARIL, S.; CHATHAM, J. C. Protein O-GlcNAcylation: a new signaling paradigm for the cardiovascular system. **AJP: Heart and Circulatory Physiology**, v. 296, n. 1, p. H13–H28, 2008.

LACZY, B.; HILL, B. G.; WANG, K.; PATERSON, A. J.; WHITE, C. R.; XING, D.; CHEN, Y. F.; DARLEY-USMAR, V.; OPARIL, S.; CHATHAM, J. C. Protein O-GlcNAcylation: a new signaling paradigm for the cardiovascular system. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 296, n. 1, p. 13–28, 2009.

LIANG, Y.; ZHOU, Y.; SHEN, P. NF-kappaB and its regulation on the immune system. **Cellular & molecular immunology**, v. 1, n. 5, p. 343–350, 2004.

LILLEY, E.; ARMSTRONG, R.; CLARK, N.; GRAY, P.; HAWKINS, P.; MASON, K.; LÓPEZ-SALESANSKY, N.; STARK, A.-K.; JACKSON, S. K.; THIEMERMANN, C.; NANDI, M. Refinement of animal models of sepsis and septic shock. **Shock**, v. 43, n. 4, p. 304–16, 2015.

LIMA, V. V.; GIACHINI, F. R.; CARNEIRO, F. S.; CARNEIRO, Z. N.; SALEH, M. A.; POLLOCK, D. M.; FORTES, Z. B.; CARVALHO, M. H. C.; ERGUL, A.; WEBB, R. C.; TOSTES, R. C. O-GlcNAcylation contributes to augmented vascular reactivity induced by ET-1. **Hypertension**, v. 55, n. 1, p. 180–188, 2010.

LIMA, V. V.; GIACHINI, F. R.; CARNEIRO, F. S.; CARVALHO, M. H. C.; FORTES, Z. B.; WEBB, R. C.; TOSTES, R. C. O-GlcNAcylation contributes to the vascular effects of ET-1 via activation of the RhoA/Rho-kinase pathway. **Cardiovascular Research**, v. 89, n. 3, p. 614–622, 2011a.

LIMA, V. V.; GIACHINI, F. R. C.; CARNEIRO, F. S.; CARNEIRO, Z. N.; FORTES, Z. B.; CARVALHO, M. H. C.; WEBB, R. C.; TOSTES, R. C. Increased vascular O-GlcNAcylation augments reactivity to constrictor stimuli — Vasoactive Peptide Symposium. **Journal of the American Society of Hypertension**, v. 2, n. 6, p. 410–417, nov. 2008.

LIMA, V. V.; GIACHINI, F. R. C.; CHOI, H.; CARNEIRO, F. S.; CARNEIRO, Z. N.; FORTES, Z. B.; CARVALHO, M. H. C.; WEBB, R. C.; TOSTES, R. C. Impaired vasodilator activity in deoxycorticosterone acetate-salt hypertension is associated with increased protein O-GlcNAcylation. **Hypertension**, v. 53, n. 2, p. 166–174, 2009a.

LIMA, V. V.; RIGSBY, C. S.; HARDY, D. M.; WEBB, R. C.; TOSTES, R. C. O-GlcNAcylation: a novel post-translational mechanism to alter vascular cellular signaling in health and disease: focus on hypertension. **Journal of the American Society of Hypertension**, v. 3, n. 6, p. 374–387, 2009b.

LIMA, V. V.; GIACHINI, F. R.; HARDY, D. M.; WEBB, R. C.; TOSTES, R. C. O-GlcNAcylation: a novel pathway contributing to the effects of endothelin in the vasculature. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 300, p. 236–250, 2011b.

LIMA, V. V.; SPITLER, K.; CHOI, H.; WEBB, R. C.; TOSTES, R. C. O-GlcNAcylation and oxidation of proteins: is signalling in the cardiovascular system becoming sweeter? **Clinical Science**, v. 123, p. 473–486, 2012.

MACAULEY, M. S.; WHITWORTH, G. E.; DEBOWSKI, A. W.; CHIN, D.; VOCADLO, D. J. O-GlcNAcase uses substrate-assisted catalysis: Kinetic analysis and development of highly selective mechanism-inspired inhibitors. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 27, p. 25313–25322, 2005.

MANTOVANI, A.; SICA, A.; SOZZANI, S.; ALLAVENA, P.; VECCHI, A.; LOCATI, M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. **Trends in Immunology**, v. 25, n. 12, p. 677–686, 2004.

MARSHALL, S.; BACOTE, V.; TRAXINGER, R. R. Discovery of a metabolic pathway mediating glucose-induced desensitization of the glucose transport system: Role of hexosamine biosynthesis in the induction of insulin resistance. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 8, p. 4706–4712, 1991.

MASSON, E.; WIERNSPERGER, N.; LAGARDE, M.; EL BAWAB, S. Glucosamine induces cell-cycle arrest and hypertrophy of mesangial cells: implication of gangliosides. **The Biochemical journal**, v. 388, n. Pt 2, p. 537–544, 2005.

MCCLAIN, D. A.; LUBAS, W. A.; COOKSEY, R. C.; HAZEL, M.; PARKER, G. J.; LOVE, D. C.; HANOVER, J. A. Altered glycan-dependent signaling induces insulin resistance and hyperleptinemia. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 16, p. 10695–10699, 2002.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.

MULVANY, M. J.; HALPERN, W. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. **Circulation Research**, v. 41, n. 1, p. 19–26, 1 jul. 1977.

NGOH, G. A.; FACUNDO, H. T.; ZAFIR, A.; JONES, S. P. O-GlcNAc signaling in the cardiovascular system. **Circulation Research**, v. 107, n. 2, p. 171–185, 2010.

NÖT, L. G.; MARCHASE, R. B.; FÜLÖP, N.; BROCKS, C. A.; CHATHAM, J. C. Glucosamine Administration Improves Survival Rate After Severe Hemorrhagic Shock Combined With Trauma in Rats. **Shock**, v. 28, n. 3, p. 345–352, 2007.

NUNES, K. P.; RIGSBY, C. S.; WEBB, R. C. RhoA/Rho-kinase and vascular diseases: What is the link? **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, n. 22, p. 3823–3836, 2010.

RODRIGUES, L. A.; FRACASSO, J. F. Vascular hyporeactivity to angiotensin II induced by Escherichia coli endotoxin is reversed by Nw-Nitro-L-Arginine, an inhibitor of nitric oxide synthase. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, v. 28, n. 3, p. 341–345, 2007.

RUETTEN, H.; THIEMERMANN, C. Effect of calpain inhibitor I, an inhibitor of the proteolysis of I kappa B, on the circulatory failure and multiple organ dysfunction caused by endotoxin in the rat. **British Journal of Pharmacology**, v. 121, n. 4, p. 695–704, 1997.

SAFAR, M. E.; BOUDIER, H. S. Vascular development, pulse pressure, and the mechanisms of hypertension. **Hypertension**, v. 46, n. 1, p. 205–209, 2005.

SALOMÃO, R.; BRUNIALTI, M. K. C.; MARTINS, P. S. **Sepse - Capítulo 16: Toll-like Receptors, CD14 e Padrões Moleculares Associados a Patógenos**.

SEKO, T.; ITO, M.; KUREISHI, Y.; OKAMOTO, R.; MORIKI, N.; ONISHI, K.; ISAKA, N.; HARTSHORNE, D. J.; NAKANO, T. Activation of RhoA and inhibition of myosin phosphatase as important components in hypertension in vascular smooth muscle. **Circulation Research**, v. 92, n. 4, p. 411–418, 2003.

SHANKAR-HARI, M.; PHILLIPS, G.; LEVY, M.; SEYMOUR, C.; LIU, V.; DEUTSCHMAN, C.; ANGUS, D.; RUBENFELD, G.; SINGER, M. Developing a New Definition and Assessing New Clinical Criteria for Septic Shock. **Jama**, v. 315, n. 8, p. 775, 2016.

SILVA-SANTOS, E. da; ASSREUY, J. Long-lasting changes of rat blood pressure to vasoconstrictors and vasodilators induced by nitric oxide donor infusion: involvement of potassium channels. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 290, n. 1, p. 380–387, 1999.

SILVA, E.; PEDRO, M. D. A.; SOGAYAR, A. C. B.; MOHOVIC, T.; SILVA, C. L. D. O.; JANISZEWSKI, M.; CAL, R. G. R.; DE SOUSA, E. F.; ABE, T. P.; DE ANDRADE, J.; DE MATOS, J. D.; REZENDE, E.; ASSUNÇÃO, M.; AVEZUM, A.; ROCHA, P. C. S.; DE MATOS, G. F. J.; BENTO, A. M.; CORRÊA, A. D.; VIEIRA, P. C. B.; KNOBEL, E. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). **Critical Care**, v. 8, n. 4, p. 251–260, 2004.

SINGER, M.; DEUTSCHMAN, C. S.; SEYMOUR, C. W.; SHANKAR-HARI, M.; ANNANE, D.; BAUER, M.; BELLOMO, R.; BERNARD, G. R.; CHICHE, J.-D.; COOPERSMITH, C. M.; HOTCHKISS, R. S.; LEVY, M. M.; MARSHALL, J. C.; MARTIN, G. S.; OPAL, S. M.; RUBENFELD, G. D.; VAN DER POLL, T.; VINCENT, J.-L.; ANGUS, D. C. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). **Jama**, v. 315, n. 8, p. 801, 2016.

SINGLETON, K. D.; WISCHMEYER, P. E. Glutamine Induces Heat Shock Protein Expression Via O-Glycosylation and Phosphorylation of HSF-1 and Sp1. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 1, p. 371–376, 2008.

TANIGUCHI, L. U.; BIERRENBACH, A. L.; TOSCANO, C. M.; SCHETTINO, G. P. P.; AZEVEDO, L. C. P. Sepsis-related deaths in Brazil: an analysis of the national mortality registry from 2002 to 2010. **Critical Care**, v. 18, n. 6, p. 608, 2014.

TANIGUCHI, L. U.; ISSA, V. S. **Sepse - Capítulo 5: Função miocárdica e distúrbios hemodinâmicos e de microcirculação.**

TITHERADGE, M. A. Nitric oxide in septic shock. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1411, p. 437–455, 1999.

TORRES, C.-R.; HART, G. W. Topography and Polypeptide Distribution of Terminal N-Acetylglucosamine Residues on the Surfaces of Intact Lymphocytes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 259, n. March 10, p. 3308–3317, 1984.

VERRECK, F. A. W.; DE BOER, T.; LANGENBERG, D. M. L.; HOEVE, M. A.; KRAMER, M.; VAISBERG, E.; KASTELEIN, R.; KOLK, A.; DE WAAL-MALEFYT, R.; OTTENHOFF, T. H. M. Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)**, v. 101, n. 13, p. 4560–4565, 2004.

WALKEY, A. J.; LAGU, T.; LINDENAUER, P. K. Trends in Sepsis and Infection Sources in the United States: A population-based study. **Annals of the American Thoracic Society**, v. 12, n. 2, p. 216–220, 2015.

WOLKOW, P. P. Involvement and dual effects of nitric oxide in septic shock. **Inflammation Research**, v. 47, p. 152–166, 1998.

WRIGHT, J. N.; COLLINS, H. E.; WENDE, A. R.; CHATHAM, J. C. O-GlcNAcylation and cardiovascular disease. **Biochemical Society Transactions**, v. 45, n. 2, p. 545–553, 2017.

XING, D.; FENG, W.; NO, L. G.; MILLER, A. P.; ZHANG, Y.; CHEN, Y.; MAJID-HASSAN, E.; CHATHAM, J. C.; OPARIL, S.; AP, M.; ZHANG, Y.; YF, C.; JC, C.; INCREASED, O. S. Increased protein O-GlcNAc modification inhibits inflammatory and neointimal responses to acute endoluminal arterial injury. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 295, p. 335–342, 2008.

XING, D.; GONG, K.; FENG, W.; NOZELL, S. E.; CHEN, Y. F.; CHATHAM, J. C.; OPARIL, S. O-GlcNAc modification of nf-kb p65 inhibits tnf-a-induced inflammatory mediator expression in rat aortic smooth muscle cells. **PLoS ONE**, v. 6, n. 8, 2011.

YANG, S.; ZOU, L.; BOUNELIS, P.; CHAUDRY, I.; CHATHAM, J. C.; MARCHASE, R. B. Glucosamine Administration During Resuscitation Improves Organ Function After Trauma Hemorrhage. **Shock**, v. 25, n. 6, p. 600–607, 2006.

YANG, X.; ONGUSAHA, P. P.; MILES, P. D.; HAVSTAD, J. C.; ZHANG, F.; SO, W. V.; KUDLOW, J. E.; MICHELL, R. H.; OLEFSKY, J. M.; FIELD, S. J.; EVANS, R. M. Phosphoinositide signalling links O-GlcNAc transferase to insulin resistance. **Nature**, v. 451, n. February, p. 964–970, 2008.

ZACHARA, N. E.; HART, G. W. Cell signaling, the essential role of O-GlcNAc! **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1761, p. 599–617, 2006.

ZACHARA, N. E.; VOSSELLER, K.; HART, G. W. Detection and analysis of proteins modified by O-linked N-acetylglucosamine. **Current Protocols in Protein Science**, n. 410, 2012.

ZOU, L.; YANG, S.; CHAMPATTANACHAI, V.; HU, S.; CHAUDRY, I. H.; MARCHASE, R. B.; CHATHAM, J. C. Glucosamine improves cardiac function following trauma-hemorrhage by increased protein O-GlcNAcylation and attenuation of NF- κ B signaling. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 296, n. 2, p. H515-23, 2009.

ZOU, L.; YANG, S.; HU, S.; CHAUDRY, I. H.; MARCHASE, R. B.; CHATHAM, J. C. 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. 402–408, 2007.

Anexos

9 ANEXOS

9.1 Certificados emitidos pela Comissão de Ética em Experimentação Animal

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Comissão de Ética em Experimentação Animal

3602-3301

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 019/2013, sobre o projeto intitulado “*Efeitos do aumento de O-glicosilação com N-acetil-glucosamina (O-GlcNAc) na ativação e diferenciação de macrófagos de camundongos Balb/c.*”, sob a responsabilidade da **Professora Doutora Rita de Cassia Aleixo Tostes Passaglia** está de acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** em reunião de 27 de maio de 2013.

We certify that the protocol nº 019/2013, entitled “*Effects of augmented O-GlcNAcylation on activation and differentiation of macrophages from Balb/c mice*”, is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from the School of Medicine of Ribeirão Preto of the University of São Paulo in 05/27/2013.

Ribeirão Preto, 27 de maio de 2013.

Prof. Dr. Oméro Benedicto Poli-Neto
Presidente da Comissão de Ética em
Experimentação Animal FMRP-USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Comissão de Ética no Uso de Animais – FMRP - USP

3602-3301

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 196/2013, sobre o projeto intitulado “*Papel da modificação por O-Glicosilação (O-GlcNAc) na disfunção vascular associada à sepse*”, sob a responsabilidade da **Professora Doutora Rita de Cassia Aleixo Tostes Passaglia** está de acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** em reunião de 26 de fevereiro de 2014.

We certify that the protocol nº 196/2013, entitled “*The role of O-GlcNAcylation (O-GlcNAc) in vascular dysfunction associated with sepsis*”, is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from the School of Medicine of Ribeirão Preto of the University of São Paulo in 02/26/2014.

Ribeirão Preto, 26 de fevereiro de 2014.

Prof. Dr. Alceu Afonso Jordão Júnior
Vice-Presidente da Comissão de Ética em
Experimentação Animal, em exercício