



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**O PAPEL DA O-GLICOSILAÇÃO COM
N-ACETILGLUCOSAMINA NA GESTAÇÃO**

VANESSA DELA JUSTINA

GOIÂNIA-GO
2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

☐ Dissertação ☒ Tese

2. Nome completo do autor

Vanessa Dela Justina

3. Título do trabalho

O PAPEL DA O-GLICOSILAÇÃO COM N-ACETILGLUCOSAMINA NA GESTAÇÃO

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento ☒ SIM ☐ NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

a) consulta ao(a) autor(a) e ao(a) orientador(a);

b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.

O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por **Fernanda Regina Casagrande Giachini Vitorino, Usuário Externo**, em 05/08/2021, às 15:59, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **VANESSA DELA JUSTINA, Discente**, em 06/08/2021, às 15:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site

[https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0)

[acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **2260480** e o código CRC **CB437F82**.

Referência: Processo nº 23070.029874/2021-53

SEI nº 2260480

VANESSA DELA JUSTINA

**O PAPEL DA O-GLICOSILAÇÃO COM
N-ACETILGLUCOSAMINA NA GESTAÇÃO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, como pré-requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Farmacologia e Fisiologia

Orientador: Profa. Dra. Fernanda Regina Casagrande Giachini Vitorino

GOIÂNIA-GO

2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Dela Justina, Vanessa

O papel da O-Glicosilação com N-acetilglucosamina na gestação
[manuscrito] / Vanessa Dela Justina. - 2021.
x, 83 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Fernanda Regina Casagrande Giachini
Vitorino.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de
Ciências Biológicas (ICB), Programa de Pós-graduação em Ciências
Biológicas, Goiânia, 2021.

Bibliografia. Anexos.

Inclui siglas, fotografias, abreviaturas, tabelas, lista de figuras, lista
de tabelas.

1. O-GlcNAc. 2. Placenta. 3. Artéria uterina. 4. Progesterona. 5.
Relaxamento. I. Vitorino, Fernanda Regina Casagrande Giachini,
orient. II. Título.

CDU 612



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ATA DE DEFESA DE TESE

Ata Nº 92 da sessão de Defesa de Tese do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas que confere a **Vanessa Dela Justina** o título de Doutora em Ciências Biológicas, na área de concentração em Farmacologia e Fisiologia.

Aos catorze dias do mês de junho de 2021, a partir das 14:00 horas, por videoconferência, realizou-se a sessão pública de Defesa de Tese intitulada “O PAPEL DA O-GLICOSILAÇÃO COM N-ACETILGLUCOSAMINA NA GESTAÇÃO”. Os trabalhos foram instalados pela Orientadora, Professora Doutora Fernanda Regina Casagrande Giachini Vitorino (UFMT) com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Professora Doutora Fernanda Bruschi Marinho Priviero (University of South Carolina), membro titular externo; Professora Doutora Rita de Cassia Aleixo Tostes Passaglia (USP), membro titular externo; Professor Doutor Fernando Paranaíba Filgueira (UFG - ICB), membro titular externo; Professor Doutor Carlos Henrique de Castro (UFG - ICB), membro titular interno. Durante a arguição os membros da banca **não** sugeriram alteração do título do **trabalho**. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Tese tendo sido a candidata **aprovada** pelos seus membros. Proclamados os resultados pela Professora Doutora Fernanda Regina Casagrande Giachini Vitorino, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, aos catorze dias do mês de junho de 2021.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA

Documento assinado eletronicamente por **Rita de Cassia Aleixo Tostes Passaglia, Usuário Externo**, em 14/06/2021, às 17:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Carlos Henrique De Castro, Professor do Magistério Superior**, em 14/06/2021, às 17:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fernanda Regina Casagrande Giachini Vitorino, Usuário Externo**, em 14/06/2021, às 17:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fernando Paranaíba Filgueira, Professor do Magistério Superior**, em 14/06/2021, às 18:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Manoel Francisco Biancardi, Vice-Coordenador**, em 15/06/2021, às 14:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site

[https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0)

[acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **2128959** e o código CRC **1306CF29**.

Referência: Processo nº 23070.029874/2021-53

SEI nº 2128959

Dedicatória

Se eu fui capaz de chegar até o doutorado foi graças aos meus pais que sempre me incentivaram a me dedicar ao estudo, mesmo durante o colégio. Vocês sempre foram minha base na vida, no estudo e no mundo. Vocês são exemplos de que eu poderia chegar aonde quisesse e me dediquei especialmente para esse resultado todos os dias da minha vida. Esse doutorado é prova do amor e apoio incondicional de vocês. Certamente não chegaria até onde estou sem os pais dedicados e amorosos que tive. A vocês, meu muito obrigado! Dedico essa tese e toda minha jornada a vocês.

Dedico este trabalho ao meu anjinho que se uniu à **Deus** tão cedo e ao meu querido Murilo que faz companhia todos os dias na barriga da mamãe. Amo tanto vocês dois!

Agradecimentos

Antes de tudo, quero agradecer a **Deus**, por ter abençoado todos os dias da minha vida, por iluminar meu caminho e me dar forças para seguir sempre em frente.

Foram muitas as pessoas que estiveram ao meu lado durante essa caminhada. Talvez eu não consiga expressar toda a minha gratidão por meio de palavras...

Agradeço ao meu marido Renan Machado pelo apoio incansável, pelo incentivo e pela compreensão das minhas escolhas feitas que me trouxesse a conclusão com sucesso do doutorado. Obrigada por estar sempre ao meu lado e me dar força, afeto e carinho dia após dia. Eu te amo muito.

Às minhas irmãs Daiani Dela Justina e Tainara Dela Justina pelo apoio, torcida e confiança que sempre depositam em mim; pelos momentos que não estivemos juntos e souberam entender. Obrigada!

Agradeço à professora Fernanda Regina C. Giachini Vitorino, a oportunidade de tê-lo como orientadora de Mestrado, Doutorado e agora Pós-Doutorado. Tenho muito orgulho de citá-la como uma das responsáveis pela minha formação profissional. Agradeço pela confiança, pela amizade, conselhos e paciência. Você é um exemplo de simplicidade, compreensão e competência. Todos que trabalham com você admiram sua dedicação e amor ao trabalho, a pesquisa com os alunos e orientados. Enfim, vai muito além do que o dever impõe. Preocupada não só com a realização do trabalho, mas principalmente com o ser humano. Aprendemos a trabalhar em grupo, a respeitar o próximo e, principalmente, que é muito mais fácil multiplicar quando sabemos dividir. Seus orientados sabem que sempre terão uma amiga e um lugar onde encontrarão apoio e palavras de sabedoria. MUITÍSSIMO obrigada!!! E que eu possa sempre contar com o privilégio da sua amizade.

Aos meus queridos amigos Jéssica, Raiany e Rinaldo, pessoas muito especiais, com quem tive a honra de conviver durante a graduação e pós-graduação. Agradeço pelos maravilhosos momentos que tivemos juntos. Vocês são exemplos de

determinação, força, generosidade e bondade. Mesmo alguns de nós tomando caminhos diferentes, nosso carinho e preocupação um com os outros, não foram abalados.

À Fernanda Priviero, “minha mãe americana”, que fez parte de uma super conquista minha. Agradeço as horas que passou ao meu lado me ajudando, me ensinando e, acima de tudo, sendo uma amiga com quem pude contar sempre. Você é um exemplo de dedicação, empenho e solidariedade. Muito obrigado pela paciência, por sempre estar disposta a me ajudar. Obrigado por tudo!

Agradeço aos meus colegas de laboratório Biologia Vascular pelos momentos de questionamento (Lab Meeting) e divertimento.

Ao professor R. Clinton Webb pela oportunidade de realizar um ano do meu doutorado em seu laboratório em Augusta , Geórgia – USA.

Agradeço a todos os professores por todos os ensinamentos transmitidos e pela contribuição no meu processo de aprendizado.

Em especial ao professor Victor Vitorino Lima, com quem aprendo muito. Agradeço por toda paciência, confiança, carinho e amizade. Foi um convívio sempre prazeroso e enriquecedor. Minha admiração pelo seu caráter, ética e postura. A você minha eterna gratidão.

Por fim, um agradecimento especial a minha banca, nomeadamente Profa. Dra. Rita Tostes, Profa Dra. Fernanda Priviero, Prof. Dr. Carlos Castro e Prof. Dr. Fernando Filgueira, por terem aceitado meu convite e terem participado desta etapa importante na minha vida. Todas sugestões e críticas realizadas tornaram este trabalho mais forte.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	V
LISTA DE FIGURAS	VI
LISTA DE TABELAS	VII
RESUMO	VIII
ABSTRACT	X
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Placenta	5
1.2 Artéria Uterina	8
1.2.1 <i>Fatores vasoativos na artéria uterina</i>	9
1.3 O-glicosilação com N-acetilglucosamina (O-GlcNAc)	11
2. OBJETIVOS	15
2.1 Objetivo Geral	15
2.1.1 <i>O-GlcNAc vs. função placentária</i>	15
2.1.2 <i>O-GlcNAc vs. artéria uterina</i>	15
3. METODOLOGIA	17
3.1 O-GlcNAc, função placentária e função da artéria uterina	17
3.1.1 <i>Animais</i>	17
3.1.2 <i>Indução da hiperglicemia severa</i>	17
3.1.3 <i>Indução da hiperglicemia moderada</i>	17
3.1.4 <i>Acasalamento e retirada das placentas</i>	18
3.1.5 <i>Western blot</i>	18
3.1.6 <i>Morfometria</i>	20
3.1.7 <i>Imunohistoquímica</i>	21
3.1.8 <i>Análise estatística</i>	22
3.1.9 <i>Animais</i>	23
3.1.10 <i>Acasalamento</i>	23
3.1.11 <i>Tratamento com glucosamina</i>	23
3.1.12 <i>Reatividade vascular</i>	23
3.1.13 <i>Western blot</i>	24
3.1.14 <i>Análise estatística</i>	25
4. ARTIGO EM FORMATO PARA PUBLICAÇÃO OU PUBLICADOS	27
4.1 ARTIGO 1	27
O-linked N-acetyl-glucosamine deposition in placental proteins varies according to maternal glycemic levels	27

4.2	ARTIGO 2.....	28
	O-GlcNAc impairs endothelial function in uterine arteries from virgin but not pregnant rats: The role of GSK3 β	28
5.	CONCLUSÕES	29
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30
7.	ANEXO (S).....	48
7.1	Anexo 1 – Comitê de ética artigo 1.....	48
7.2	Anexo 2 – Comitê de ética artigo 2.....	49
7.3	Anexo 3 – Preparo de soluções	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh: acetilcolina

AU: artéria uterina

cNOS: NOS constitutiva

CO₂: gás carbônico

COX: ciclooxigenase

Ct: citotrofoblasto

DOCA: acetato de desoxicorticosterona

DOCA: acetato de desoxicorticosterona

eNOS: óxido nítrico sintase endotelial

Ep: espongiotrofoblasto

GSK3 β : glicogênio sintase quinase 3 - beta

iNOS: óxido nítrico sintase indutível

KCa: canais de potássio ativados por cálcio

L-NAME: N(G)-Nitro-L-arginine methyl ester

MPT: modificação pós-traducional

nNOS: óxido nítrico sintase neural

NO: óxido nítrico

NOS: óxido nítrico sintase

NP: não prenhas

NPS: nitroprussiato de sódio

OGA: O-GlcNAcase

O-GlcNAc: O-Glicosilação com β -N-acetilglucosamina

OGT: O-GlcNAc transferase

P: prenhas

Sc: sinciciotrofoblasto

ZJ: zona juncional

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática das artérias que promovem a irrigação uterina	1
Figura 2: Hipótese do trabalho. O aumento da O-Glicosilação com N-acetilglucosamina (O-GlcNAc) altera processos fisiológicos importantes que acontecem durante a gestação, incluindo: a (I) função placentária e (II) a função vascular da artéria uterina.....	4
Figura 3: Primeiros estágios de desenvolvimento da placenta humana. Imagem demonstra as etapas iniciais da formação da placenta após a implantação do blastocisto. (A, B) Os estágios pré-lacunares. (C) Estágio lacunar. (D) Estágio viloso primário. Abreviações: 1 ^o ys, saco vitelino primário; ac, cavidade amniótica; cs, concha citotrofoblástica; eec, celoma extra-embrionário; exm, mesoderme extra-embrionário; GE, epitélio glandular; ICM, massa celular interna; lac, lacunas; LE, epitélio luminal; mn. tr, trofoblasto mononuclear; pr. syn, sincício primário; TE, trofotoderma; vs, vasos sanguíneos	6
Figura 4: Comparação anatômica da placenta de ratos (A) e humanos (B)	8
Figura 5: Via de Biossíntese da Hexosamina (VBH)	13

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Relação dos anticorpos primários e secundários e suas respectivas diluições	16
Tabela 2: Relação dos anticorpos primários e secundários e suas respectivas diluições	21

RESUMO

A O-Glicosilação com N-acetilglucosamina (O-GlcNAc) é uma modificação pós-traducional que modula diversas proteínas. O aumento da O-glicosilação é observado durante a hiperglicemia, favorecendo a disfunção endotelial bem como alterações placentárias. A hipótese desse trabalho foi que o aumento da O-Glicosilação durante a gestação, gera a disfunção vascular e placentária, resultando em um suporte nutricional inadequado entre a interface materno-fetal. Para isso, o trabalho foi dividido em duas partes. ***PARTE I. Caracterizar como diferentes níveis glicêmicos afetam a O-GlcNAcilação de proteínas em diferentes regiões placentárias.*** Ratas Wistar fêmeas foram divididas nos seguintes grupos: hiperglicemia grave (> 300 mg/dL; $n = 5$); hiperglicemia leve (> 140 mg/dL, pelo menos dois momentos no teste oral de tolerância à glicose; $n = 7$) ou normoglicemia (< 120 mg/dL; $n = 5$). Observou-se que as células das zonas labiríntica e juncional são direcionadas pelo acúmulo de O-GlcNAc em resposta à hiperglicemia severa, possivelmente devido à expressão reduzida de O-GlcNAcase (OGA). A O-GlcNAcilação não é observada durante hiperglicemia leve, possivelmente devido à expressão/ atividade compensatória da OGA. Além disso, alterações morfométricas, ocorrendo simultaneamente com o aumento de O-GlcNAcilação na placenta, pode contribuir para a disfunção placentária durante a hiperglicemia. ***PARTE II: Avaliar se o aumento de O-GlcNAc reduz a função endotelial da artéria uterina.*** Ratas prenhas (P) ou não-prenhas (NP) foram tratadas com glucosamina (300 mg/Kg) ou veículo, por 21 dias, i.p. O tratamento com glucosamina aumentou a expressão de O-GlcNAc na AU de ratas NP. Observou-se diminuição no relaxamento dependente de endotélio em AU de ratas NP tratadas, comparadas com o veículo, o qual foi abolido pela incubação do inibidor da óxido nítrico-sintase endotelial (eNOS). A atividade da eNOS bem como expressão total da Akt encontram-se diminuídas após o tratamento com glucosamina em ratas NP. Além disso, AUs de ratas NP tratadas com glucosamina apresentaram aumento na ativação da enzima glicogênio sintase quinase 3 beta (GSK3 β), bem como o aumento na expressão de OGT. Curiosamente, durante a prenhez, o tratamento com glucosamina diminui a expressão de O-GlcNAc em AU, acompanhado por uma melhora no relaxamento para acetilcolina, enquanto as atividades de eNOS e GSK3 β e as expressões totais de Akt e OGT permaneceram inalteradas. O relaxamento endotélio-independente

não foi alterado nos grupos estudados. Portanto, o mecanismo subjacente que ocorre entre a P e NP é, pelo menos em parte, dependente da modulação de Akt/GSK3 β /OGT. Acreditamos que, durante a gravidez, as alterações hormonais desempenham um papel protetor vascular, prevenindo a disfunção endotelial induzida pela O-glicosilação. No futuro, será interessante avaliar se estratégias que normalizem os níveis de O-GlcNAcilação em proteínas placentárias resultarão no sucesso gestacional em condições patológicas, incluindo hiperglicemia.

Palavras-Chave: O-GlcNAc; Placenta; Artéria uterina; Progesterona; Relaxamento.

ABSTRACT

O-linked N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) is a post-translational modification that modulates several proteins. The increase in O-Glycosylation is observed during hyperglycemia, favoring endothelial dysfunction as well as placental modifications. The hypothesis of this work was that the increase in O-Glycosylation during pregnancy, generates vascular and placental dysfunction, resulting in inadequate nutritional support between the maternal-fetal interface. For this, the work was divided in two parts. **PART I:** *To characterize how different glycemic levels affect O-GlcNAcylation of cells in different placental regions.* Female Wistar rats were divided into the following groups: severe hyperglycemia (>300 mg/dL; n= 5); mild hyperglycemia (> 140 mg/dL, at least two moments in the oral glucose tolerance test; n= 7) or normoglycemia (<120 mg/dL; n= 5). Cells in the labyrinth and junctional zones are targeted by the accumulation of O-GlcNAc in response to severe hyperglycemia, possibly due to reduced O-GlcNAcase (OGA) expression. O-GlcNAc is not seen during mild hyperglycemia, possibly due to OGA compensatory expression/activity. In addition, morphometric changes, occurring simultaneously with increased accumulation of O-GlcNAc in placental tissue, can contribute to placental dysfunction during hyperglycemia. **PART II:** *To assess whether the increase in O-GlcNAc impairs the endothelial function of the uterine artery.* Pregnant (P) or non-pregnant (NP) rats were treated with glucosamine (300mg/kg) or vehicle for 21 days, i.p. Glucosamine treatment increased the expression of O-GlcNAc in UA in NP rats. A decrease in endothelium-dependent relaxation was observed in UA of treated NP rats, compared to the vehicle, which was abolished by incubation of the nitric oxide synthase inhibitor (eNOS). eNOS activity as well as total Akt expression are reduced after treatment with glucosamine in NP rats. In addition, UAs from NP rats treated with glucosamine showed an increase in the activation of glycogen synthase kinase 3 beta (GSK3 β), as well as an increase in the expression of OGT. Interestingly, during pregnancy, treatment with glucosamine decreases the expression of O-GlcNAc in UA, accompanied by an improvement in relaxation for acetylcholine, while the activities of eNOS and GSK3 β and the total expressions of Akt and OGT remained unchanged. Endothelium-independent relaxation was not altered in the groups studied. Therefore, the underlying mechanism that occurs between P and NP is, at least in part, dependent on Akt/GSK3 β /OGT modification. We believe that, during

pregnancy, hormonal changes play a vascular protective role, preventing endothelial dysfunction induced by O-glycosylation. In the future, it will be interesting to assess whether strategies that normalize *O-GlcNAcylation* levels in placental proteins will result in gestational success in pathological conditions, including hyperglycemia.

Key Words: *O-GlcNAc*; Placenta; Uterine artery; Progesterone; Relaxation.

IMPACTO E RELEVÂNCIA DA PESQUISA PARA SOCIEDADE

Durante a gravidez, o bebê em desenvolvimento recebe todos os nutrientes por meio de um órgão muito importante chamado placenta. A placenta por sua vez vai ser nutrida por um vaso sanguíneo materno, chamado artéria uterina. Caso a artéria uterina, bem como a placenta não funcione bem, isso poderá prejudicar o crescimento do bebê em formação, e até mesmo ser prejudicial para a saúde da mãe. Em nosso estudo queremos avaliar se o aumento de um resíduo de açúcar produzido em nosso organismo, chamado O-GlcNAc, poderia causar algum dano placentário ou para a artéria uterina. O-GlcNAc é muito importante durante a gestação, mas o seu aumento exagerado pode resultar em danos para o bebê e para a mãe. Esse açúcar, em específico, pode estar aumentado em diversas doenças metabólicas como é o caso da diabetes e da hipertensão. Para avaliar se O-GlcNAc gerar prejuízos durante a gestação, inicialmente aumentamos os níveis desse açúcar em ratas prenhes por duas formas diferentes. Primeiro, através do aumento da glicose, imitando o diabetes. Segundo, através do seu substrato glucosamina, que aumenta os níveis de O-GlcNAc sem gerar diabetes. Nosso estudo mostrou que a medida que o açúcar O-GlcNAc aumentou durante a gravidez, ele foi capaz de induzir problemas na placenta, bem como modificou o comportamento da artéria uterina, gerando prejuízos ao feto em desenvolvimento.

1. INTRODUÇÃO

Durante a gestação, a placenta é o órgão onde correm as trocas nutricionais e gasosas, sendo que esse órgão é uma interface física que separa a circulação materna da fetal. Para garantir o crescimento, o desenvolvimento e a sobrevivência intrauterina, a placenta induz modificações circulatórias que acabam por direcionar ao útero maior volume de sangue.

A placenta desempenha um papel essencial na manutenção da gravidez e crescimento fetal. A morfogênese e o desenvolvimento da placenta requerem um processo coordenado de proliferação e diferenciação de células trofoblásticas. Ela está exposta a influência de hormônios regulatórios, fatores de crescimento, substratos e citocinas presentes em ambas as circulações e, conseqüentemente, pode ser afetada por qualquer mudança que ocorra nestes fatores (1,2).

Estruturas importantes ligam a circulação sanguínea materna à fetal, como as arteríolas espiraladas, veia e artéria umbilical, que permitem quantificar o fluxo uteroplacentário e avaliar a boa oxigenação fetal, e ramos terminais das artérias uterinas, as quais atuam como canais de comunicação com a cavidade do útero e o espaço intervilo [Figura 1 (3–6)].

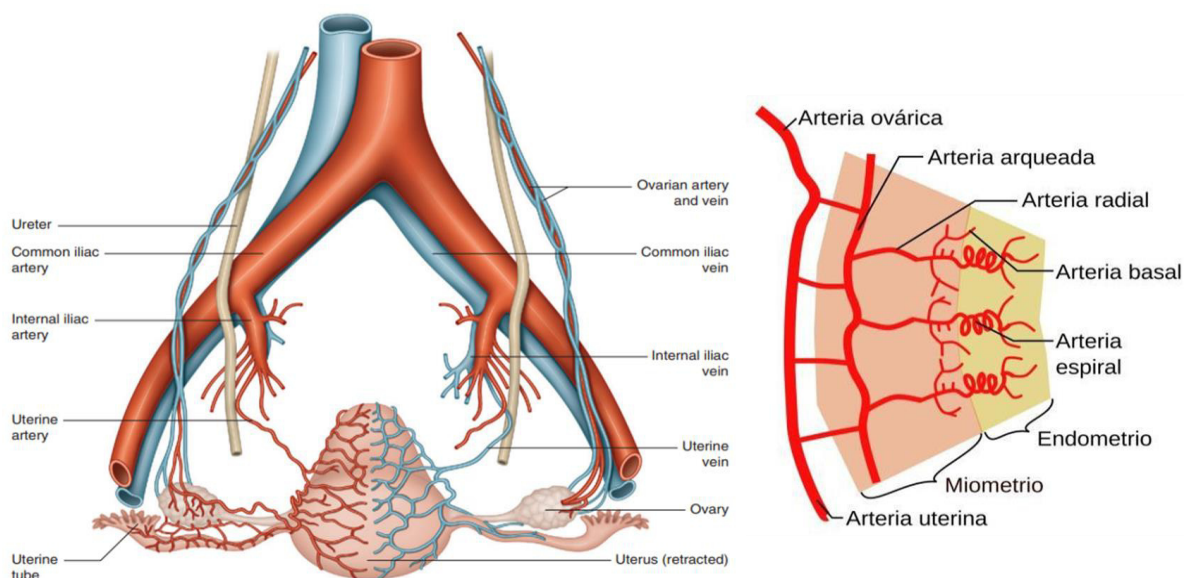


Figura 1: Representação esquemática das artérias que promovem a irrigação uterina. Fonte: Adaptado de Barral e Croibier, 2011.

A vasculatura uterina sofre alterações acentuadas durante a gravidez para proporcionar o necessário aumento do fluxo sanguíneo para suportar o crescimento e a nutrição do útero, da placenta e do feto em desenvolvimento. Desta forma, a disfunção vascular na artéria uterina pode acarretar diversas patologias durante a gestação, diretamente decorrentes da disfunção placentária, tais como, fetos pequenos para a idade gestacional, restrição de crescimento intrauterino e pré-eclâmpsia (7).

O fluxo sanguíneo é um processo altamente controlado por fatores sistêmicos e teciduais, através da adaptação do volume luminal por mecanismos de vasodilatação e a vasoconstrição. Localmente, esses processos podem ser reguladas por fatores relaxantes ou constritores, derivados do próprio tecido vascular ou perivascular; em resposta ao estresse de cisalhamento (*shear stress*); e às diversas substâncias circulantes, modulando desta forma o tônus vascular. Fatores derivados do endotélio, bem como hormônios e neurotransmissores circulantes, atuam na musculatura lisa vascular, estimulando ou inibindo as proteínas contráteis (8,9). Mais recentemente, o tecido perivascular também foi implicado como produtor de substâncias vasoativas (10).

As principais substâncias produzidas pelo endotélio vascular com propriedades vasodilatadoras são a prostaciclina, bradicinina, acetilcolina, histamina e o óxido nítrico (NO), enquanto que a endotelina 1, angiotensina II e as catecolaminas atuam como fatores vasoconstritores (11).

Dentro os hormônios, a progesterona e o estrogênio apresentam funções importantes no desenvolvimento da gestação, bem como desempenham uma atividade vasodilatadora (12–14). De fato, 17 beta-estradiol e progesterona ativam o relaxamento vascular dependente do endotélio via NO, prostaciclina e fator hiperpolarizante dependente do endotélio (15,16).

Conforme a gestação progride, a concentração de NO bem como a atividade/expressão da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) aumentam atingindo um pico máximo antes do parto, deixando evidente que o NO favorece a vasodilatação durante a gestação (17). Importante mencionar que a manutenção da pressão sanguínea, e conseqüentemente do fluxo sanguíneo, é dependente da produção endotelial constante de NO, entre outros fatores. Quando há um desequilíbrio na sua síntese, como nos estados patológicos, a musculatura lisa não

relaxa apropriadamente, resultando em favorecimento do estado contrátil e consequente aumento da pressão sanguínea (18,19).

Grande importância tem-se dado à *O-GlcNAc*, visto que várias proteínas importantes para a regulação vascular são alvos dessa MPT. Como exemplos, podem-se citar as enzimas eNOS, fosfolipase C, proteína quinase C, fosfatidilinositol 3-quinase, entre outras, demonstrando que *O-GlcNAc* apresenta um papel importante na disfunção vascular (23). Sabe-se que a eNOS é alvo da modificação pós-traducional (MPT) por *O*-glicosilação com N-acetilglucosamina (*O-GlcNAc*) em tecidos como aorta de ratos (20), aorta bovina (21) e em pênis de ratos (22).

Ademais, durante a gestação, níveis fisiológicos de *O-GlcNAc* são requeridos para a formação do blastocisto e para a diferenciação metabólica durante o período de implantação. Entretanto, o aumento exacerbado dessa MPT acarreta diminuição na proliferação celular, bem como redução na formação de blastocisto, demonstrando que a mesma exerce um papel crítico nas etapas iniciais do desenvolvimento fetal (24).

A *O-GlcNAc* é um processo altamente dinâmica e reversível, controlada exclusivamente por duas enzimas: *O-GlcNAc* transferase (OGT), que catalisa a adição de N-acetilglucosamina, e *O-GlcNAcase* (OGA), que catalisa a remoção hidrolítica do sacarídeo de proteínas alvo (25–27).

Frente ao exposto, justifica-se a importância de realizar estudos sobre a ocorrência da *O-GlcNAc* durante a prenhez. **Sendo assim, nossa hipótese é que o aumento da *O-GlcNAc* placentário e vascular altere negativamente o processo gestacional (Figura 2).**

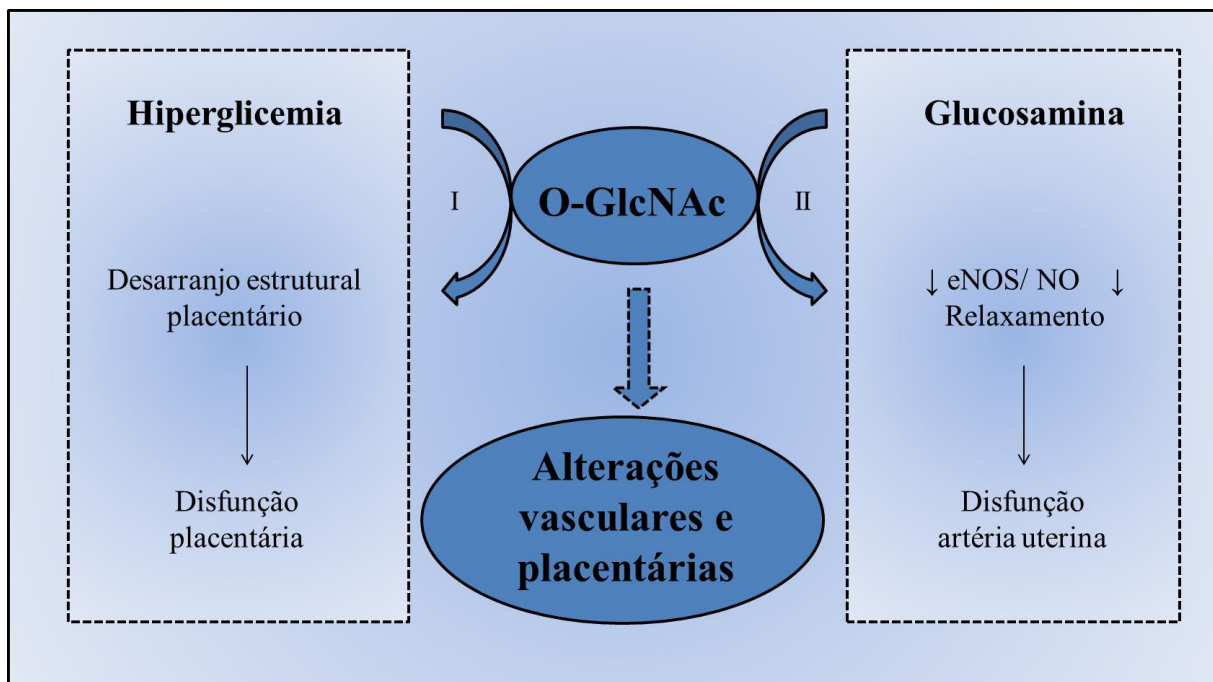


Figura 2: Hipótese do trabalho. O aumento da O-Glicosilação com N-acetilglucosamina (O-GlcNAc) placentária e vascular altere negativamente o processo gestacional, incluindo: a (I) função placentária e (II) a função vascular da artéria uterina.

1.1 Placenta

A placenta é um complexo órgão que exerce papéis pleiotrópicos durante o crescimento fetal. Além de ser responsável por permitir a absorção de nutrientes, eliminação de resíduos bem como de trocas gasosas entre a mãe e o feto, a placenta também tem uma função de barreira fisiológica e imunológica, separando a circulação materna e fetal. Diferentes superfícies tipos celulares compõem essa região da interface materno-fetal, como por exemplo, o sinciotrofoblasto, que expõe a placenta para lado da circulação materna e o endotélio, que está em contato com o sangue fetal (3). O funcionamento placentário é passível à influência de hormônios regulatórios, citocinas, fatores de crescimento e substratos presentes tanto na circulação materna quanto fetal e, conseqüentemente, pode ser afetada por qualquer mudança que ocorra nestes fatores (1,2).

A placenta desempenha um papel essencial na manutenção da gravidez e crescimento fetal. Tanto a morfogênese [Figura 3; (28)] como o desenvolvimento da placenta requerem um processo coordenado de proliferação e diferenciação de células trofoblásticas. Neste contexto, a invasão adequada do trofoblasto no epitélio uterino é essencial para a implantação do embrião e placentação em mamíferos (29,30).

O desenvolvimento da placenta humana é caracterizado por 3 períodos distintos. No começo da gestação há uma série de processos críticos de proliferação e diferenciação, predominante de células do trofoblasto, permitindo a formação das estruturas vilosas e extravilosas. Posteriormente, a placenta se ancora no útero e remodela as artérias espiraladas, tornando-os vasos com baixa resistência vascular. Depois, as vilosidades se diferenciam através de várias etapas de maturação. Durante a primeira metade da gestação, o trofoblasto sofre alterações marcantes, enquanto que uma extensa angiogênese e vascularização ocorrem na segunda metade da gestação (1).

A morfogênese placentária resulta da interação entre os tecidos de origem materna e embrionária que ocorre na implantação, a qual leva a formação das regiões claramente diferenciadas reconhecidas na placenta de roedores: a zona do labirinto, a zona juncional (ZJ) e a linhagem da decídua materna (31).

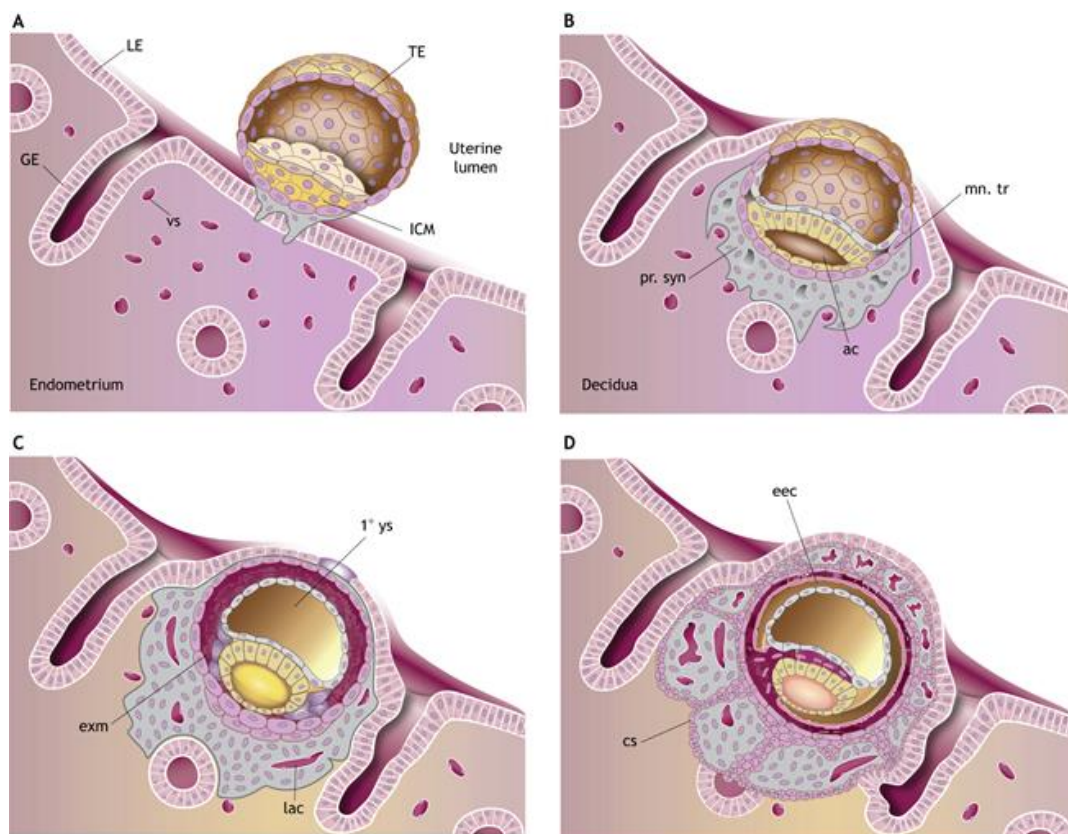


Figura 3: Primeiros estágios de desenvolvimento da placenta humana. Imagem demonstra as etapas iniciais da formação da placenta após a implantação do blastocisto. (A, B) Os estágios pré-lacunares. (C) Estágio lacunar. (D) Estágio viloso primário. Abreviações: **1° ys**, saco vitelino primário; **ac**, cavidade amniótica; **cs**, concha citotrofoblástica; **eec**, celoma extra-embriônico; **exm**, mesoderme extra-embriônica; **GE**, epitélio glandular; **ICM**, massa celular interna; **lac**, lacunas; **LE**, epitélio luminal; **mn. tr**, trofoblasto mononuclear; **pr. syn**, sincício primário; **TE**, trofotoderma; **vs**, vasos sanguíneos. Fonte: Adaptado de Turco e Moffett, 2019.

Em roedores, a placentação começa com a proliferação de células trofoblásticas, na qual formam o cone ectoplacentar. As células derivadas do cone posteriormente se diferenciam para formarem o labirinto (local onde os nutrientes e os gases estão sendo trocados entre a mãe e o feto) (32,33). Em seguida, as células de trofoblasto coriônico começam a se diferenciar nas várias camadas das células trofoblásticas do labirinto: as células do sinciciotrofoblasto (Sc) e citotrofoblasto (Ct) (34,35).

O epitélio trofoblástico, que entra em contato direto com o sangue materno, é referido como o citotrofoblasto. O citotrofoblasto pode ser facilmente discernido pelo seu grande núcleo esférico com nucléolo proeminente. Ele exibe numerosas microvilosidades na sua superfície e contém muitas vesículas pinocitóticas na posição basal, que tem por função realizar a endocitose de líquidos ou pequenas

partículas (36). As células de citotrofoblasto formam uma camada contínua que reveste os espaços de sangue materno na placenta (37).

Enquanto a região do labirinto está em desenvolvimento, ele é apoiado estruturalmente pelo espongiotrofoblasto (Ep), que forma uma camada compacta de células entre o labirinto e as células gigantes externas. As células do Ep são as principais constituintes da ZJ e tem como função contribuir na atividade endócrina, enquanto que as células gigantes do trofoblasto possuem certa capacidade de produção hormonal, o que as caracterizam como células endócrinas da placenta (31,38).

A ZJ é localizada entre a decídua e o labirinto, e tem função de aderir a placenta ao útero, sendo que essa região contém vários tipos de células trofoblásticas com diferentes funções: células trofoblásticas gigantes (medeiam o processo de implantação e invasão no útero; produzem citocinas e hormônios que regulam o sistema imunológico local), células espongiotrofoblásticas (secreção de hormônios e citocinas; limitar o crescimento do endotélio materno na placenta fetal) e células de glicogênio (armazenamento de glicogênio como fonte de nutrição) (39–42).

Estruturas lacunares passam pela ZJ e transportam sangue a partir das artérias em espiral para o labirinto, local onde os nutrientes são trocados com o sangue fetal, o que caracteriza a importância da relação entre as diferentes regiões que compõe a interface da placenta (43,44).

A formação da decídua materna é estimulada pela invasão das células trofoblásticas gigantes na parede uterina, resultando na proliferação inicial e subsequente diferenciação e hipertrofia das células do estroma uterino. A diferenciação das células deciduais é regulada por fatores produzidos pelas células trofoblásticas gigantes (45–47). As células de trofoblasto estimulam a liberação de fatores imuno-regulatórios e de crescimento a partir da decídua que são necessários para o crescimento do feto e promovem a formação de vasos sanguíneos maternos que levam sangue até o sítio de implantação através das artérias espiraladas (48).

Basicamente, a placenta humana tem três regiões que são análogas àsquelas da placenta de ratos: uma camada decidual mais distante com artérias espiralares; a placa basal em humanos é análoga a ZJ; o conjunto de vilosidades da placenta em humanos é análogo ao labirinto, embora as vilosidades sejam menos densamente compactadas e o espaço intervilooso mais aberto se comparado ao arranjo do labirinto em roedores (Figura 4) (35).

Os inúmeros e complexos eventos que dão origem a estrutura e a funcionalidade da placenta bem como a importância do seu papel no desenvolvimento embrionário evidenciam o fato de que durante a gestação, esse órgão é essencial no crescimento e na sustentação fetal e que mesmo pequenos erros durante a placentação podem resultar em consequências negativas severas (49).

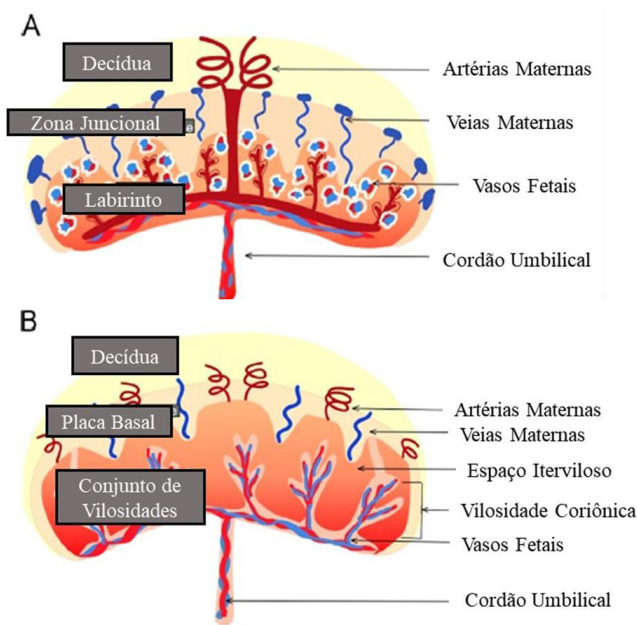


Figura 4: Comparação anatômica da placenta de ratos (A) e humanos (B). Adaptado de Rai e Cross, 2012.

1.2 Artéria Uterina

Uma gestação saudável está associada à grandes respostas adaptativas no sistema cardiovascular materno. Pode-se citar como exemplos de mudanças no sistema hemodinâmico durante uma gravidez o aumento no débito cardíaco, a redução da resistência vascular e a expansão do volume plasmático (50–52).

O desenvolvimento vascular placentário é um processo crucial para o adequado desenvolvimento fetal. Responsável pela metade do fluxo sanguíneo que irriga a metade superior do útero, a artéria uterina exerce importante função durante a gestação, visto todo o processo de placentação envolver células trofoblásticas fetais que invadem o útero e se decidualizam para posterior desenvolvimento das artérias espiraladas (5).

A vasculatura uterina sofre mudanças significativas durante a gestação, uma vez que é responsável pela adequada perfusão na interface materna-fetal. Dessa forma, durante a gravidez, o crescimento gestacional da vasculatura uterina é acompanhado por hipertrofia e hiperplasia da parede arterial (53), vasoconstrição e vasodilatação neurogênica (54), profunda vasodilatação (55,56) e redução do tônus vascular (57). Todas essas alterações culminam na diminuição da resistência vascular uterina, possibilitando um aumento de 20 vezes do fluxo sanguíneo nessa artéria durante a gestação (58), resultando no fornecimento de grande parte do fluxo sanguíneo ao útero (5,59).

Os mecanismos envolvidos na redução do tônus vascular observado na gestação implicam na diminuição de fatores endógenos contráteis e/ou aumento da contribuição dos fatores endógenos vasodilatadores. De fato, foi demonstrado que artérias uterinas de ratas prenhes apresentam diminuição da contribuição das vias contráteis RhoA/Rho quinase e proteína quinase C (PKC) em resposta ao agente contrátil U-46619 (análogo do tromboxano) comparado ao grupo virgem (58). Para além, durante a gestação, artérias uterinas de ovelhas apresentam um aumento da liberação de NO através da diminuição do cálcio intracelular na musculatura lisa vascular bem como artérias uterinas de mulheres gestantes exibem aumento da expressão e atividade da eNOS (56,60).

1.2.1 Fatores vasoativos na artéria uterina

A disfunção placentária está associada a um desequilíbrio dos fatores vasoativos circulantes que, por sua vez, acarreta em falta de adaptação vascular materna levando a disfunção endotelial sistêmica (59).

O NO desempenha um papel importante na fisiologia reprodutiva em mamíferos, especialmente no sistema uteroplacentário. Estudos demonstraram sua participação na invasão trofoblástica extravilosa da decídua e do miométrio, na regulação da reatividade vascular da circulação útero-placentária-fetal, a fim de prevenir agregação e adesão plaquetária e neutrofilia no espaço intervilloso e na apoptose trofoblástica (61). A artéria uterina é alvo de disfunção vascular em diversas patologias, incluindo o diabetes *mellitus*, hipertensão e a pré-eclâmpsia. A etiologia dessas disfunções parece estar correlacionada com início do desenvolvimento embrionário, podendo encontrar-se exacerbadas em condições de estresse oxidativo, tensão de oxigênio e distúrbios metabólicos, como é o caso da

hiperglicemia. Assim, o funcionamento da artéria uterina, a vasculogênese placentária, a angiogênese e a função vascular são processos inter-relacionados que influenciam o crescimento fetal durante a gestação, sendo controlados por vários mediadores vasoativos, na qual o NO é o mais importante, visto este ser liberado em pequenas quantidades para regular o fluxo sanguíneo e inibir interações entre plaquetas circulantes, células brancas e a parede do vaso (61,62). Estudos mostraram que o endotélio de vasos coriônico e umbilical liberam NO e que seu efeito vasodilatador é maior do que da prostaciclina (62).

Apesar do NO ser o principal mediador do relaxamento na artéria uterina, outras vias de sinalização também podem contribuir para o relaxamento dependente de endotélio, porém em magnitude menor (63,64). Por exemplo, foi demonstrado que a atividade dos canais de potássio ativados por cálcio (KCa) é alterado do estado não gravídico para o gravídico em camundongos, resultando em aumento da vasodilatação bem como do diâmetro da artéria uterina (65,66). Para além, artérias uterinas de ratas prenhes incubadas com inibidor não seletivo para ciclooxigenase (COX) apresentam uma diminuição de 40% do relaxamento dependente do endotélio induzido pela aspirina, quando comparado ao grupo controle (64).

Foi demonstrado um aumento de eNOS no endotélio vascular na artéria uterina de mulheres gestantes, quando comparado com mulheres não gestantes. Com relação a isoforma neural (nNOS), ambos os grupos apresentaram marcação nas fibras nervosas, principalmente na adventícia da artéria uterina, porém sem diferença entre mulheres gestantes e não gestantes, indicando que o aumento da atividade da NOS é devido a isoforma eNOS e não nNOS (60).

Frente a patologias como diabetes e pre-eclâmpsia, a adaptação útero-placentária é inadequada, podendo resultar em incompleta ou ausente invasão das artérias espiraladas, lesão endotelial e aumento da contração vascular (67). A disfunção endotelial, no estado de diabetes, pode ser desencadeada por moléculas pró-inflamatórias, aumento do estresse oxidativo, disfunção mitocondrial e alterações de vias de sinalização que levam à inativação da eNOS (68).

O NO é produzido a partir da oxidação do aminoácido essencial L-arginina em L-citrulina. Esta reação é catalisada através da enzima óxido nítrico sintase (NOS), que possui três principais isoformas agrupadas em duas categorias, a NOS constitutiva (cNOS), dependente de cálcio/calmodulina, e a NOS indutível (iNOS), independente de cálcio, sendo ativada por macrófagos e citocinas inflamatórias

(61,69). Uma vez induzida, a iNOS tem a capacidade de produzir NO por um longo período, podendo resultar em processos patológicos (70). cNOS é subdividida em NOS neural (nNOS), presente normalmente nos neurônios, mas também descrito em outras células como os cardiomiócitos; e NOS endotelial (eNOS), expressa constitutivamente nas células endoteliais e plaquetas (61).

A produção e ação do NO é realizada em função de estímulo de mensageiros químicos ou mecânicos no endotélio vascular. Assim que estas substâncias químicas se ligam ao seu receptor no endotélio ou se estímulos mecânico ativam mecanorreceptores, a célula endotelial produz uma molécula mensageira, NO, que se difunde pelas células do músculo lisas vasculares adjacentes ao endotélio, promovendo o relaxamento do músculo liso (71,72).

Durante a gestação, os níveis de progesterona se encontram elevados, uma vez que este hormônio é crucial para a manutenção da gravidez. Suas ações podem ser genômicas ou não-genômicas, atuando através de diversos receptores (73). Esta última, ações não-genômicas, são mediadas através de receptores para progesterona associados às membranas e inclui aumento da atividade de eNOS e produção de NO através da via de sinalização da Akt (74,75).

A quinase Akt, também conhecida como proteína quinase B, regula proliferação celular, apoptose e metabolismo de glicogênio. Esta enzima é ativada através da fosforilação dos sítios treonina 308 ou serina 473 e é responsável pela fosforilação de substratos proteicos, incluindo a GSK3 β (76,77). Diferentemente de outras quinases, a GSK3 β se encontra ativa basalmente e é inativada por fosforilação, principalmente via estimulação Akt (78,79). Para além, norgestrel, uma progesterona sintética, foi demonstrada mediar a inativação de GSK3 β em células fotorreceptores (80), bem como o tratamento com progesterona resulta em aumento de expressão de Akt-fosforilada e diminuição da GSK3 β em neurônios (81).

Interessantemente, GSK3 β fosforila a OGT resultando em sua ativação. De importância, OGT é uma enzima específica encontrada na VBH que adiciona o sacarídeo O-GlcNAc em proteínas intracelulares (82).

1.3 O-glicosilação com N-acetilglucosamina (O-GlcNAc)

Descoberto inicialmente em 1984 por Torres and Hart (83), a O-glicosilação com N-acetilglucosamina (O-GlcNAc) é um processo importante que participa da regulação de diversas proteínas e vias fisiológicas/metabólicas. Essa MPT ocorre

majoritariamente de forma intracelular, em proteínas citoplasmáticas e nucleares, e sua ocorrência é descrita em praticamente todas as células eucariotas pluricelulares. Entretanto, o papel da O-GlcNAc em vários sistemas fisiológicos, incluindo o reprodutivo, começou a ser caracterizada mais atualmente, devido as dificuldades nas técnicas associada ao seu estudo (84).

Várias proteínas podem ser modificadas por O-GlcNAc, como por exemplo os fatores de transcrição, proteínas ribossomais, proteínas de sinalização celular, proteínas do citoesqueleto, componentes do complexo do poro nuclear, receptores nucleares de hormônios, quinases, fosfatases e proteínas reguladoras de actina. A modificação com este sacarídeo é essencial em mamíferos e O-GlcNAc é crítico na capacidade das células suportarem uma variedade de formas de estresse (25,85).

O processo de O-GlcNAc é altamente dinâmico, e o ciclo de adição/remoção da porção do sacarídeo é rápido, análogo ao que ocorre no processo da fosforilação/desfosforilação de proteínas, que nesse último caso, são catalisadas por quinases e fosfatases. De fato, a evidência existente sugere que essa modificação tem uma relação "*yin-yang*" com a fosforilação proteica, e em alguns casos, observa-se a competição entre O-GlcNAcilação e fosforilação pelos mesmos resíduos ou resíduos adjacentes. Muitos locais de fosforilação, bem como sítios adjacentes, foram mapeados para locais de modificação via O-GlcNAc. Tal localização espacial indica que O-GlcNAc pode regular proteínas alvo através da competição com enzimas quinases. Estudos utilizando inibidores de fosfatase e quinase forneceram evidências diretas para uma relação recíproca geral entre glicosilação e fosforilação em algumas proteínas (84,86). Entretanto, apesar de apresentarem muitas propriedades semelhantes, estas duas modificações são reguladas de modo muito diferente (87). Mais de 500 quinases fosforilam suas proteínas alvo com especificidade de sequência distinta. Em contrapartida, apenas uma única enzima, OGT, catalisa a adição de N-acetilglucosamina, e paralelamente, a enzima OGA realiza a remoção hidrolítica de O-GlcNAc em células de mamíferos (Figura 3) (25–27).

Vários processos conseguem modular a atividade da OGT. Dentre eles, foi demonstrado que a atividade da OGT é dependente da sua fosforilação, que ocorre com a ação da enzima GSK3 β nos sítios serina 03 e 04 (82) e da concentração do seu substrato UDP-GlcNAc, que é altamente sensível ao fluxo de nutrientes tais

como: glicose, ácidos graxos e aminoácidos (88), através da Via de Biossíntese da Hexosamina (VBH; Figura 5) (25,26,86,89).

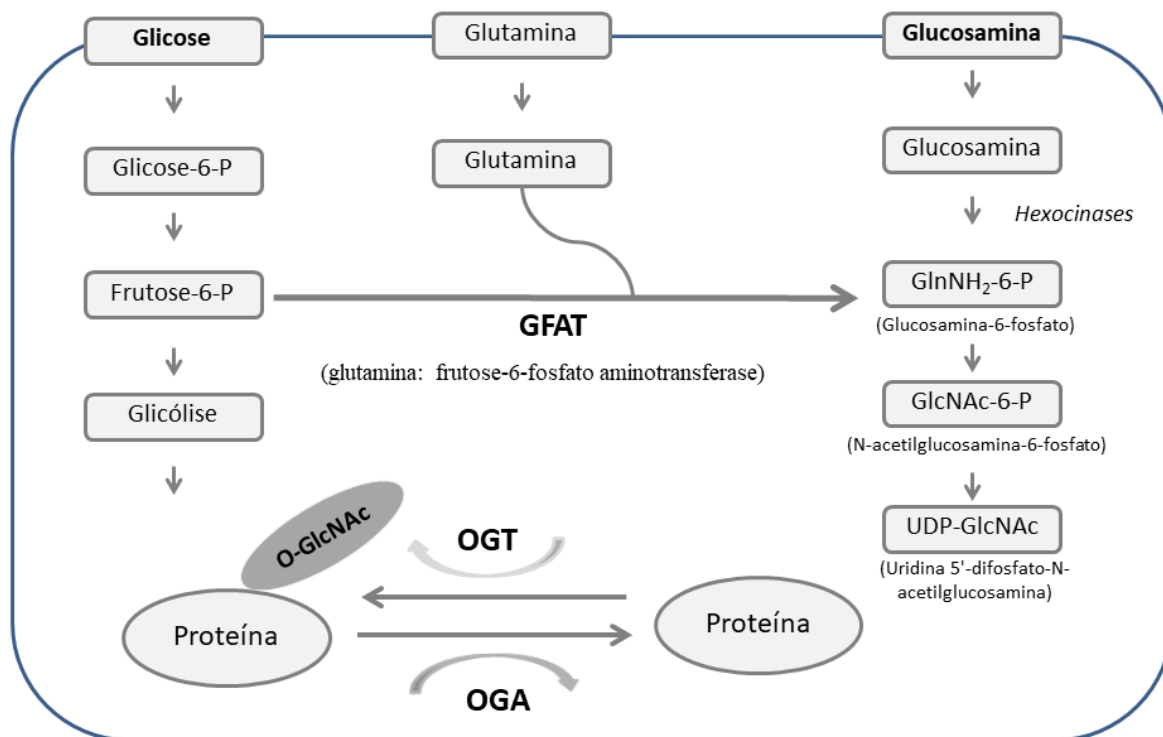


Figura 5: Via de Biossíntese da Hexosamina (VBH). Adaptado de Lima et al, 2012.

Diversas proteínas envolvidas na regulação do tônus vascular sofrem MPT para serem ativadas/inibidas, incluindo O-GlcNAc. De fato, aortas de machos Wistar hipertensos (DOCA; acetato de desoxicorticosterona) apresentam diminuição da expressão das enzimas Akt bem como eNOS fosforilada (20), evidenciando que o mesmo local de fosforilação destas proteínas também pode ser alvo para O-GlcNAc (21). Neste contexto, foi demonstrado que aumento de O-GlcNAc inibe sua ativação dependente da Akt, sugerindo que o sítio para O-GlcNAc é o mesmo ou adjacente ao da fosforilação de Akt (21).

Para além, estudos demonstram que o aumento de O-GlcNAc (via glicose/glucosamina) resulta na diminuição de eNOS fosforilada em pênis de ratos diabéticos (22), em arteríolas do músculo gracilis de ratos Wistar (90) e em células endoteliais coronárias humanas (91).

De forma importante, níveis excessivamente aumentados de glicemia na circulação durante a gestação podem acarretar em efeitos negativos no tecido placentário. Estudos demonstram que em condições de hiperglicemia, observa-se

aumento da *O-GlcNAc* com consequente diminuição da proliferação celular, bem como a redução da formação de blastocisto, demonstrando que essa MPT exerce um papel crítico nas etapas iniciais do desenvolvimento fetal (92).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral do presente trabalho foi avaliar se o aumento de *O-GlcNAc* resulta em distúrbios de processos gestacionais. Para isso, o trabalho foi dividido em 2 objetivos específicos:

2.1.1 *O-GlcNAc vs. função placentária*

Caracterizar como diferentes níveis glicêmicos afetam a *O-GlcNAcilação* de proteínas em diferentes regiões placentárias:

- Quantificar a expressão de *O-GlcNAc* nas diferentes áreas placentárias de ratas com hiperglicemia severa ou moderada;
- Determinar a expressão placentária de OGT e OGA em ratas com hiperglicemia severa ou moderada;
- Avaliar como diferentes níveis glicêmicos afetam a área das diferentes regiões placentárias.

2.1.2 *O-GlcNAc vs. artéria uterina*

Avaliar se o aumento de *O-GlcNAc* resulta em disfunção da artéria uterina:

- Avaliar a expressão global de *O-GlcNAc* em proteínas extraídas da artéria uterina;
- Caracterizar a reatividade vascular da artéria uterina, através da obtenção de curvas concentração-resposta para relaxamento endotélio-dependente (acetilcolina), na presença ou ausência do inibidor farmacológico inespecífico da NOS, L-NAME;
- Caracterizar a reatividade vascular da artéria uterina, através da obtenção de curvas concentração-resposta para relaxamento endotélio-independente (nitroprussiato de sódio);
- Determinar a expressão total de Akt;
- Avaliar a atividade de ativação da eNOS através da fosforilação do sítio serina1177;

OBJETIVOS

- Avaliar a atividade de inibição da GSK3- β através da fosforilação do sítio serina09;
- Avaliar a atividade de ativação da GSK3- β através da fosforilação do sítio tirosina216;
- Determinar a expressão da enzima OGT.

3. METODOLOGIA

3.1 *O-GlcNAc*, função placentária e função da artéria uterina

3.1.1 *Animais*

Foram utilizadas ratas Wistar de 12 a 14 semanas de idade [(n= 5, grupo hiperglicêmico) e (n=7, grupo controle)], pesando entre 200 a 250 gramas, provenientes do Laboratório Fisiotox do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Mato Grosso.

Os animais foram mantidos com livre oferta de água e ração, em uma temperatura de $21 \pm 1^{\circ}\text{C}$, com ciclos de claro e escuro de 12 horas cada. Todos os procedimentos experimentais realizados nesse estudo foram aprovados pela Comissão de Ética de Experimentação Animal nº 23108.120946/2015-83 (anexo 1) e estão de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal.

3.1.2 *Indução da hiperglicemia severa*

Ratas Wistar adultas foram induzidas ao estado hiperglicêmico por estreptozotocina (STZ; cat. #S0130S; Sigma), dissolvida em tampão citrato [0,1M; pH 6,5; anexo 3], em uma única dose de 40 mg/kg de peso, aplicado por via intraperitoneal [Adaptado de (93)]. Ratas do grupo controle receberam igual volume de solução salina estéril, pela mesma via de administração. Os níveis glicêmicos das ratas foram medidos após dois dias da indução da hiperglicemia ou administração de solução salina, em jejum de 8 horas, utilizando um glicosímetro digital (*Accu-Chek Active®* - Roche) com amostras de sangue periférico obtidos por punção da veia caudal. Foram consideradas hiperglicêmicas as ratas que apresentaram níveis glicêmicos acima de 350 mg/dL, após a administração de STZ, e normoglicêmicas as ratas que apresentaram níveis glicêmicos abaixo de 120 mg/dL, após administração do veículo.

3.1.3 *Indução da hiperglicemia moderada*

A hiperglicemia moderada foi induzida em ratas Wistar no primeiro dia de vida, a partir da administração de STZ dissolvida em tampão citrato (0,1M; pH 6,5; anexo 3), em uma única dose de 100 mg/kg de peso, aplicado por via intraperitoneal. Ratas do grupo controle receberam igual volume de solução salina estéril, pela mesma via de administração. Entre os 90 e 100 dias de vida as mesmas foram induzidas ao teste

oral de tolerância a glicose (TOTG) a fim de determinar os critérios de inclusão. O TOTG foi conduzido após seis horas de jejum, através da determinação da glicemia a partir de uma gota de sangue coletada por punção venosa da cauda, determinando assim a glicemia no tempo zero. Em seguida, foi administrado uma solução de glicose (2 g/kg de peso corporal) via gavagem e medido os níveis de glicose no sangue nos tempos 30, 60 e 120 minutos após a administração da solução. Foram consideradas integrantes do grupo as ratas que apresentaram TOTG anormal, com pelo menos dois ou mais pontos com níveis glicêmicos maiores que 140 mg/dL, com limite máximo de 300 mg/dL. Essas medidas foram utilizadas para estimar a área total, utilizando o método matemático trapezoidal proposto por Tai (94).

3.1.4 Acasalamento e retirada das placentas

Ratas Wistar virgens controles e hiperglicêmicas (severa e moderada) foram mantidas com machos Wistar normoglicêmicos durante o período noturno (18:00 - 08:00 horas), em uma proporção de 4 fêmeas para cada macho. Os machos foram separados às 8:00 horas do dia seguinte. Determinou-se a presença de espermatozoides e células queratinizadas do ciclo estral por observação do esfregaço vaginal na manhã subsequente (08:00 - 10:00 horas). Após a confirmação da presença de espermatozoides, este foi considerado o dia zero de prenhez e as ratas eram, doravante, dispostas em gaiolas individuais com forragem de maravalha, com livre acesso à água e ração durante todo o período gestacional.

Considerando que a gestação em ratas Wistar é de aproximadamente 21 dias, a retirada das placentas foi realizada na manhã do 21º dia de prenhez (entre 8:00 às 10:00 horas). As ratas foram anestesiadas com pentobarbital sódico (3%) (Thiopentax®, Cristália), utilizando dose igual a 1,5 g/Kg, intraperitonal, e subsequentemente, após comprovação da anestesia, foram submetidas à decaptação por guilhotina. Posteriormente, procedeu-se a laparotomia para exposição dos cornos uterinos e remoção das placentas.

3.1.5 Western blot

Inicialmente, as placentas foram pulverizadas mecanicamente e transferidas para tubos cônico plástico (capacidade de 1,5 mL) ao qual foram adicionados 500 µL de tampão Rippa Buffer (cat. #R0278; Sigma) acrescido de 10% de inibidor de

proteases (cat. #S8820; Sigma). Os tubos ficaram sob constante homogeneização, em rotação orbital horizontal, por 2 horas à 4°C e posteriormente foram centrifugados a 10.000 rpm, por 15 minutos, à 4°C. O sobrenadante foi acondicionado em um novo tubo cônico plástico individual, sendo que essa fração líquida contém as proteínas extraídas da placenta, e armazenadas a -80°C até o momento do uso. Uma fração do sobrenadante de cada amostra proveniente do processo de extração proteica foi submetida ao protocolo de quantificação de proteínas pelo ensaio de Bradford se baseia na mudança de absorvância do corante *Coomassie Brilliant Blue* (cat. #B6916; Sigma). Posteriormente, a placa foi lida em um comprimento de onda a 595 nm (Thermoplate, TP reader).

Em seguida, 60 µg de proteína foram utilizados para a preparação da amostra, na qual o volume total foi completado para 10 uL com tampão Rippa Buffer (cat. #R0278; Sigma) e, em seguida, acrescentado 33% (3,3 uL) de tampão de amostra [950 µL de tampão de amostra (anexo 3), 50 µL de β-mercaptoetanol], preparadas individualmente em um tubo cônico plástico (1,5 mL). As amostras foram levadas ao aquecimento a 99°C por 10 minutos e resfriadas em banho de gelo, por 10 minutos, imediatamente após esse período. A seguir, preparou-se o gel SDS-PAGE de corrida 10% e o gel de concentração de amostra (anexo 3). A cuba foi montada com o tampão de eletroforese [200 mL tampão de eletroforese 10X (anexo 3), 1800 mL H₂O destilada]. As amostras (13,3 uL de cada amostra), bem como o padrão de peso molecular (10 uL; PageRuler™, Prestained Protein Ladder, 10-180 kDa), foram aplicados individualmente nos poços do gel de concentração, e a corrida ocorreu à 4°C, por 2 horas, à 100 V. Posteriormente, realizou-se a transferência das proteínas do gel para membrana de nitrocelulose (cat. #GE10600004; Sigma), através da técnica de sanduíche (respeitando a sequência de montagem: esponja, papel de filtro, gel, membrana, papel de filtro e esponja), evitando-se a formação de bolhas na montagem. Os sanduíches foram acondicionados em cassetes específicos e colocados em uma cuba de eletroforese repleta de tampão de transferência [100 mL de tampão de transferência 10X (anexo 3), 200 mL de metanol, 700 mL de H₂O destilada] e com um cassete com gelo. A transferência ocorreu à 4°C, 100 V, por 2 horas. Após a transferência, a membrana de nitrocelulose foi então colocada em um recipiente e adicionado solução de Ponceau [200 mg Ponceau S, 1 mL ácido acético, H₂O destilada q.s.p 100mL], por 30 segundos, para verificação da correta transferência das amostras do gel para membrana e averiguação de possíveis

bolhas formadas no processo de transferência. Após a verificação do sucesso da transferência das proteínas do gel para a membrana, essa foi lavada com TBS-T [50 mL TBS-T 10X (anexo 3), 0,5 mL Tween 20, 450 mL H₂O destilada; 5 minutos cada lavagem] até retirar todo excesso de solução de Ponceau.

Após, procedeu-se o bloqueio dos sítios inespecíficos com leite 5%, submetendo as membranas à agitação (orbital e horizontal) constante por uma hora, temperatura ambiente e as membranas foram incubadas com os respectivos anticorpos primários (Tabela 1). Essa incubação foi realizada por um período de 12 horas, à temperatura de 4°C, em constante agitação horizontal em orbital. Em seguida, as membranas foram lavadas 3 vezes, por 10 minutos, com tampão TBS-T e incubadas com seus respectivos anticorpos secundários (Tabela 1), conjugados com peroxidase, por 1 hora, à temperatura ambiente e sob constante agitação horizontal em orbital.

Após a incubação com os anticorpos secundários específicos, as membranas foram lavadas 3 vezes, por 10 minutos cada, com TBS-T e a detecção dos sinais foi realizada com reagente para detecção de quimioluminescência (cat. #32209; Pierce ECL Western Blotting Substrate, Thermo Fischer). Por fim, o sinal de quimioluminescência foi detectado em um equipamento fotográfico compatível (ImageQuant LAS 4000). A intensidade das bandas foi avaliada utilizando o software

Uni Scan gel 6.1. Para normalização das membranas, utilizou-se a expressão de β -actina.

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

Anticorpo Primário	Peso Molecular	Diluição	Anticorpo Secundário	Diluição
OGA (#4200311; Sigma-Aldrich)	130 KDa	1:500	coelho	1:2000
OGT (#ab50273; Abcam)	110-117 KDa	1:500	coelho	1:2000
β-actina (#ab8227; Abcam)	42 KDa	1:3000	camundongo	1:5000

3.1.6 Morfometria

Após remoção das placentas, uma parte foi acondicionada em cassetes e fixadas em solução de Methacarn (60% metanol, 30%, clorofórmio, 10% ácido acético) durante 3 horas, à 4°C, sob agitação constante. O volume do fixador foi 20

vezes maior que o da peça coletada. Em seguida, as placentas foram desidratadas em sucessivos banhos de álcool 70%, 80% e álcool absoluto durante 30 minutos cada banho, sob agitação. Uma vez desidratadas, as placentas foram diafanizadas (clarificadas) em três banhos de xilol por 30 minutos cada banho, sob agitação. Posteriormente, as placentas foram infiltradas e inclusas em parafina.

Com auxílio de um micrótomo, foram realizados cortes de 5 µm da placenta. Em seguida, os cortes foram esticados em um banho de flutuação a 50°C, coletados do banho em lâminas de vidro previamente tratadas com poli-L-lisina 0,1% (Sigma) e levados à estufa, 60°C, para secagem.

As lâminas com os cortes foram submetidas ao processo de desparafinização em três banhos sucessivos de xilol, durante 30 minutos cada. Posteriormente, as mesmas foram hidratadas em dois banhos com álcool etílico absoluto, um banho com álcool 95% e um com álcool 70%, durante 30 minutos cada, seguido de um banho em água destilada durante 15 minutos.

Para análise morfológica, realizou-se coloração com hematoxilina-eosina na qual as lâminas foram coradas com hematoxilina de Harris durante 1 minuto, lavadas em água corrente durante 10 minutos e em água destilada por 10 minutos. Em seguida, essas coradas com eosina aquosa durante 30 segundos. As lâminas foram então desidratadas em um banho de álcool 95% e em dois banhos de álcool absoluto, durante 10 minutos cada e diafanizadas em dois banhos de xilol, durante 5 minutos cada. Por fim, foi realizada a montagem das lâminas utilizando ENTELAN como meio de adesão entre lâmina e lamínula. As imagens foram observadas através de uma lupa (Zeiss Stemi 2000-C) com uma objetiva de aumento de 1,15x. Imagens de placentas foram capturadas usando uma câmera digital Canon Power Shot G5 (Canon EUA, Lake Success, NY, EUA). A área da zona juncional e do labirinto foi medida em (mm²) utilizando-se o software IMAGE - PRO PLUS (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA).

3.1.7 *Imunohistoquímica*

Após o processo de desparafinização como descrito anteriormente, uma parte das lâminas foi submetida ao processo de recuperação antigênica através da incubação dos cortes em tampão citrato (cat. #ab64236; diluído à 1X), a 95°C, durante 25 minutos. Posteriormente, os cortes foram tratados com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 3% (v/v) em tampão fosfato salino [100 mL PBS 1 M (anexo 3),

H₂O destilada q.s.p 100 mL, pH 7,2-7,4], durante 30 min, a fim de bloquear atividade da peroxidase endógena. As seguintes etapas foram seguidas por 3 banhos com tampão (PBS 0,1 M – pH 7,2-7,4), durante 5 minutos cada. Todas as etapas foram realizadas em uma câmara úmida, e foi tomado cuidado para evitar a desidratação dos cortes. Para reduzir a marcação de sítios antigênicos inespecíficos (background), as lâminas foram bloqueadas por imersão na solução Cas-Block (cat. #008120; Life Technologies) e subsequentemente pelo soro de cabra (cat. #16210-064; Gibco), durante 30 minutos cada um. Os cortes histológicos foram incubados com o anticorpo primário anti-O-GlcNAc (#O7764; Sigma-Aldrich), 1:500 diluído em PBS contendo Tween 20 a 0,3% (v/v), overnight, à 4°C. Após extensa lavagem com PBS, todos os cortes foram incubados durante 1 hora, à temperatura ambiente, com anticorpo secundário IgG anti-mouse conjugado com peroxidase, 1:500 diluído em PBS. A reação da peroxidase foi visualizada usando o kit NovaRED (cat. #SK4800; Vector). Após imunocoloração, as seções foram levemente coloradas com hematoxilina de Mayer (Merck). Para cada reação imunohistoquímica, os controles foram realizados por incubação dos cortes com PBS ou por omissão do anticorpo primário. Os cortes foram examinados em um microscópio Zeiss Axioskop 2 e as imagens foram capturadas usando uma câmera digital (Canon) e o software KS 100 3.0 (Zeiss). As imagens foram analisadas usando o software IMAGE-PRO PLUS (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA), onde as células coradas e não coradas foram contadas individualmente e são apresentadas como células marcadas e não marcadas, descritas em porcentagem.

3.1.8 Análise estatística

Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) e "n" representa o número de animais utilizados no experimento. A análise estatística foi realizada usando o programa Prisma (GraphPad Prism 5.0, Graph Pad Software Incorporated, CA) (GraphPad Software Inc.), como ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Tukey; ou com teste *t Student*, em comparação com o respectivo grupo controle, como indicado na figura da legenda. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Para as análises de morfometria e imunohistoquímica, não houve diferença entre os dois grupos controles. Dessa forma, apenas uma imagem representativa correspondente ao grupo controle foi utilizada.

3.1.9 Animais

Foram utilizadas ratas Wistar de 12 a 14 semanas de idade (200-250 g). Os animais foram mantidos com livre oferta de água e ração, em uma temperatura de $21 \pm 1^{\circ}\text{C}$, com ciclos de claro e escuro de 12 horas cada. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética de Experimentação Animal nº 23108.902445/2018-61 (anexo 2) e estão de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal.

3.1.10 Acasalamento

Ratas Wistar virgens foram mantidas com machos Wistar durante o período noturno (18:00 - 08:00 horas), em uma proporção de 4 fêmeas para cada macho. Os machos foram separados às 8:00 horas do dia seguinte. Determinou-se a presença de espermatozoides e células queratinizadas do ciclo estral por observação do esfregaço vaginal na manhã subsequente (08:00 - 10:00 horas). Em caso positivo para a presença de espermatozoides, este foi considerado o dia zero de prenhez e as ratas eram, doravante, dispostas em gaiolas individuais com forragem de maravalha, com livre acesso à água e ração durante todo o período gestacional. Ratas não prenhes foram mantidas em gaiolas individuais pelo mesmo período, para mimetizar as condições experimentais.

3.1.11 Tratamento com glucosamina

Ratas prenhas (P) e não prenhas (NP) foram tratadas com glucosamina (300 mg/Kg; via intraperitoneal) ou veículo (salina) por 21 dias (período gestacional; grupo prenhe). O grupo NP recebeu o tratamento pelo mesmo período de tempo (21 dias).

3.1.12 Reatividade vascular

Na manhã do 21º dia de gestação, ou em um tempo equivalente para as ratas NP, os animais foram anestesiados, com pentobarbital sódico (3%) na dose 1,5g/Kg, e uma laparoscopia foi realizada para remoção da artéria uterina. As ratas foram eutanasiadas em câmara de gás carbônico (CO_2) e o útero com a vasculatura ligada foi excisada e colocada em solução fisiológica de Krebs [(mM) NaCl, 130; NaHCO_3 , 14,9; KCl, 4,7; KH_2PO_4 , 1,18; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1,56; EDTA, 0,026; Glicose 5,5]. As principais artérias uterinas foram isoladas por dissecção de tecido adiposo e

conjuntivo. Uma parte das artérias uterinas foi congelada imediatamente em nitrogênio líquido e armazenada a -80°C para análises subsequentes.

Segmentos de 2 mm de comprimento das artérias uterinas foram montados em um miógrafo (Mulvany-Halpern, modelo 610M, Danish MyoTech) para medições de força isométrica. As cubas contendo os anéis da artéria uterina foram emersos em solução fisiológica de Krebs e receberam constantemente uma mistura de gases contendo CO_2 (5%) e O_2 (95%), à 37°C . A integridade do vaso, após estabilização, foi verificada através do estímulo contrátil produzido por uma solução de cloreto de potássio (KCl, 120 mM) e a integridade do endotélio através da solução de fenilefrina [FE (1 μM)] e posteriormente acetilcolina [ACh (3 μM)] para induzir o relaxamento endotélio-dependente. Os anéis que apresentaram relaxamento menor de 80% foram considerados sem endotélio funcional e excluídos da análise final do experimento. Após sucessivas lavagens com Krebs, o relaxamento dependente de endotélio foi avaliado em artérias inicialmente contraídas com U-46619 (análogo do tromboxano; 3 μM) através de curva de concentração-resposta para ACh (1 nM - 30 μM) na presença e ausência do inibidor inespecífico da NOS [*N(G)-Nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME)* 100 μM ; 30 minutos de incubação]. O relaxamento independente de endotélio foi avaliado através de curva de concentração-resposta para nitroprussiato de sódio [(NPS); doador de óxido nítrico - 100 pM - 10 μM] em artéria inicialmente contraídas com U-46619 (3 μM).

3.1.13 Western blot

A técnica foi realizada conforme descrito anteriormente (3.1.5). As artérias uterinas foram mantidas a -80°C até o momento do seu uso. Inicialmente, estas foram pulverizadas mecanicamente e transferidas para tubos cônico plástico (capacidade de 500 μL) ao qual foram adicionados 25 μL de tampão Rippa Buffer acrescido de 10% de inibidor de proteases. Devido ao tamanho muito pequeno das artérias, um pool de 2 a 3 animais foi necessário para perfazer um $n=1$. Os tubos foram homogeneizados em vórtex (10 segundos) a cada 15 minutos por 2 horas e mantido à 4°C nos intervalos. Posteriormente, estes foram centrifugados a 10.000 rpm, por 15 minutos, à 4°C . Uma fração do sobrenadante de cada amostra proveniente do processo de extração proteica foi submetida ao protocolo de quantificação de proteínas pelo ensaio de Bradford.

Em seguida, 30 µg de proteína foram utilizadas para correr em um gel SDS-PAGE de corrida 8%, à 4°C, 100 V, por 2 horas. Posteriormente, realizou-se a transferência das proteínas do gel para membrana de nitrocelulose à 4°C, 100 V, por 2 horas. Os sítios inespecíficos foram bloqueados com leite 5% e as membranas foram incubadas com os respectivos anticorpos primários (Tabela 2). Essa incubação foi realizada por um período de 12 horas, à temperatura de 4°C, em constante agitação horizontal em orbital. No dia seguinte, as membranas foram tratadas com os respectivos anticorpos secundários (Tabela 2).

A detecção dos sinais foi realizada com reagente para detecção de quimioluminescência. Por fim, o sinal de quimioluminescência foi detectado em um equipamento fotográfico compatível (ImageQuant LAS 4000). A intensidade das bandas foi avaliada utilizando o software Uni Scan gel 6.1. Para normalização das membranas, utilizou-se a expressão de β -actina.

Tabela 2: Relação dos anticorpos primários e secundários e suas respectivas diluições.

Anticorpo Primário	Peso Molecular	Diluição	Anticorpo Secundário	Diluição
O-GlcNAc (#O7764; Sigma-Aldrich)	Vários	1:500	camundongo	1:2500
Phospho-eNOS^{Ser1177} (#9571s; Cell Signaling)	140 KDa	1:500	coelho	1:5000
Total-eNOS (#610297; BD Biosciences)	140 KDa	1:1000	camundongo	1:5000
phospho-GSK3β^{Ser09} (#9322s; Cell Signaling)	46 KDa	1:250	coelho	1:5000
phospho-GSK3β^{Tyr216} (#612313; BD Biosciences)	46 KDa	1:250	camundongo	1:5000
Total-GSK3β (#12456s; Cell Signaling)	46 KDa	1:250	coelho	1:5000
Total-Akt (9272s#; Cell Signaling)	60 KDa	1:1000	coelho	1:5000
OGT (#24083s; Cell Signaling)	110 KDa	1:1000	coelho	1:5000
β-actina (#A3854; Sigma-Aldrich)	42 KDa	1:10000	camundongo	1:50000

3.1.14 Análise estatística

Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (DP) e “n” representa o número de animais usado nos experimentos, com exceção das amostras para a técnica de western blot que tiveram um pool. O relaxamento da artéria uterina é expresso como porcentagem de alteração dos níveis inicialmente contraídos com U-46619. As curvas concentração-resposta foram analisadas por análise não-linear log (agonista) vs. resposta pelo programa Prisma (GraphPad Prism 5.0, Graph Pad Software Incorporated, CA) e dois parâmetros farmacológicos foram obtidos através dessas curvas: O efeito máximo gerado pela agonista (E_{max}) e o logaritmo negativo da concentração molar que causa 50% da resposta máxima (EC_{50}). Valores com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4. ARTIGO EM FORMATO PARA PUBLICAÇÃO OU PUBLICADOS

4.1 ARTIGO 1

Life Sci. 2018 Jul 15;205:18-25.Epub 2018 May 7.

O-linked N-acetyl-glucosamine deposition in placental proteins varies according to maternal glycemic levels

Vanessa Dela Justina¹, Rinaldo R Dos Passos Junior², Alecsander F Bressan², Rita C Tostes³, Fernando S Carneiro³, Thaigra S Soares⁴, Gustavo T Volpato², Victor Vitorino Lima², Sebastian San Martin⁵, Fernanda R Giachini⁶

¹Graduate Program in Biological Sciences, Federal University of Goiás, Goiania, GO, Brazil; Institute of Biological and Health Sciences, Federal University of Mato Grosso, Barra do Garças, MT, Brazil.

²Institute of Biological and Health Sciences, Federal University of Mato Grosso, Barra do Garças, MT, Brazil.

³Department of Pharmacology, Ribeirao Preto Medical School, University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, SP, Brazil.

⁴Department of Gynecology and Obstetrics, School of Medicine of Botucatu, Sao Paulo, SP, Brazil.

⁵Biomedical Research Center School of Medicine, Universidad de Valparaiso, Valparaiso, Chile.

⁶Graduate Program in Biological Sciences, Federal University of Goiás, Goiania, GO, Brazil; Institute of Biological and Health Sciences, Federal University of Mato Grosso, Barra do Garças, MT, Brazil.

PMID: 29746846

DOI: 10.1016/j.lfs.2018.05.013

4.2 ARTIGO 2

Eur J Pharmacol. 2020 Aug 5;880:173133. Epub 2020 Apr 25.

O-GlcNAc impairs endothelial function in uterine arteries from virgin but not pregnant rats: The role of GSK3 β

Vanessa Dela Justina¹, Fernanda Priviero², Rinaldo Rodrigues Dos Passos Jr³, R Clinton Webb², Victor Vitorino Lima⁴, Fernanda R Giachini⁵

¹Graduate Program in Biological Sciences, Federal University of Goiás, Goiânia, GO, Brazil.

²Department of Physiology, Augusta University, Augusta, GA, USA.

³Graduate Program in Biological Sciences, Federal University of Goiás, Goiânia, GO, Brazil; Institute of Biological Sciences and Health, Federal University of Mato Grosso, Barra do Garças, MT, Brazil.

⁴Institute of Biological Sciences and Health, Federal University of Mato Grosso, Barra do Garças, MT, Brazil.

⁵Graduate Program in Biological Sciences, Federal University of Goiás, Goiânia, GO, Brazil; Institute of Biological Sciences and Health, Federal University of Mato Grosso, Barra do Garças, MT, Brazil. Electronic address: fernandagiachini@hotmail.com.

PMID: 32343970 PMCID: PMC7295676 (available on 2021-08-05)

DOI: 10.1016/j.ejphar.2020.173133

5. CONCLUSÕES

A O-GlcNAc exerce funções fisiológicas essenciais durante o período gestacional, destacando-se o desenvolvimento placentário. Entretanto, seu aumento exacerbado, comumente visto em diversas condições patológicas, pode resultar em desenvolvimento placentário anormal e acarretar prejuízos no desenvolvimento fetal. Para além, durante o período gestacional, a artéria uterina desempenha um papel fundamental no aporte nutricional para a placenta e o feto em desenvolvimento. Aumento de O-GlcNAc (proporcional a severidade da hiperglicemia) resulta em uma disfunção placentária, na qual todas as regiões da placenta (destacando-se labirinto e ZJ) apresentam células alvo para essa MPT. De fato, a função da artéria uterina se encontra prejudicada frente ao aumento de *O-GlcNAc* em ratas NP e que a gestação, apresenta um papel protetor frente a disfunção endotelial causada pelo tratamento com glucosamina. Esses resultados demonstram a importância de se estudar essa MPT bem como estratégias farmacológicas que evitem a O-GlcNAcilação de proteínas placentárias/da artéria uterina ou melhorar o sucesso gestacional em condições patológicas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Desoye G, Hauguel-De Mouzon S. The human placenta in gestational diabetes mellitus: The insulin and cytokine network. *Diabetes Care*. 2007;30(2):120–6.
2. Huynh J, Dawson D, Roberts D, Bentley-Lewis R. A systematic review of placental pathology in maternal diabetes mellitus. *Placenta*. 2015;36(2):101–14.
3. Garcia-Ruiz G, Flores-Espinosa P, Preciado-Martínez E, Bermejo-Martínez L, Espejel-Núñez A, Estrada-Gutierrez G, et al. In vitro progesterone modulation on bacterial endotoxin-induced production of IL-1 β , TNF α , IL-6, IL-8, IL-10, MIP-1 α , and MMP-9 in pre-labor human term placenta. *Reprod Biol Endocrinol*. 2015;115(13):1–12.
4. Villas-Bôas JMS, Maestá I, Consonni M. Brain sparing effect: from placental insufficiency to fetal circulatory adaptation. *Rev Bras Ginecol e Obstet*. 2008;30(7):366–71.
5. Browne VA, Julian CG, Toledo-Jaldin L, Cioffi-Ragan D, Vargas E, Moore LG. Uterine artery blood flow, fetal hypoxia and fetal growth. *Philos Trans R Soc*. 2015;370(1663):1–15.
6. Barral J-P, Croibier A. Uterine vessels. In: *Visceral Vascular Manipulations*. 2011. p. 240–4.
7. Degner K, Magness RR, Shah DM. Establishment of the human uteroplacental circulation: A historical perspective. *Reprod Sci*. 2017;24(5):753–61.
8. Barclay JK, Murrant CL, Woodley NE, Reading SA. Potential interactions among vascular and muscular functional compartments during active hyperemia. *Can J Appl Physiol*. 2003;28(5):737–53.
9. Cahill PA, Redmond EM. Vascular endothelium - Gatekeeper of vessel health. *Atherosclerosis*. 2016;248:97–109.
10. Watts SW, Flood ED, Garver H, Fink GD, Roccabianca S. A New function for perivascular adipose tissue (PVAT): assistance of arterial stress relaxation. *Sci Rep*. 2020;10(1):1–11.
11. Roseguini BT, Ribeiro JP, Chiappa GR. Muscle blood flow in heart failure: Interaction between central and local factors. *Rev Hosp Clínicas Porto Alegre*. 2007;27(1):40–6.
12. Czyzyk A, Podfigurna A, Genazzani AR, Meczekalski B. The role of

- progesterone therapy in early pregnancy: from physiological role to therapeutic utility. *Gynecol Endocrinol*. 2017;33(6):421–4.
13. White MM, Zamudio S, Stevens T, Tyler R, Lindenfeld J, Leslie K, et al. Estrogen, progesterone, and vascular reactivity: Potential cellular mechanisms. *Endocr Rev*. 1995;16(6):739–51.
14. Gupta S, Mehrotra S, Villalón C, De Vries R, Garrelds I, Saxena P, et al. Effects of female sex hormones on responses to CGRP, acetylcholine, and 5-HT in rat isolated arteries. *Headache*. 2007;47(4):564–75.
15. Cairrao E, Alvarez E, Carvas JM, Santos-Silva AJ, Verde I. Non-genomic vasorelaxant effects of 17 β -estradiol and progesterone in rat aorta are mediated by L-type Ca²⁺ current inhibition. *Acta Pharmacol Sin*. 2012;33(5):615–24.
16. Mata KM, Li W, Reslan OM, Siddiqui WT, Opsasnick LA, Khalil RA. Adaptive increases in expression and vasodilator activity of estrogen receptor subtypes in blood vessel-specific pattern during pregnancy. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol*. 2015;2(53):1679–96.
17. Durán-Reys MOG, Meléndez MRG, Gómez JJH. Nitric oxide as regulator of hemodynamic changes in pregnancy. *Ginecol Obs Mex*. 1999;67:29–36.
18. Queiroz SL. Funções biológicas do óxido nítrico. *Quim Nova*. 1999;44(4):1–12.
19. Triggle CR, Samuel SM, Ravishankar S, Marei I, Arunachalam G, Ding H. The endothelium: influencing vascular smooth muscle in many ways. *Can J Physiol Pharmacol*. 2012;90(6):713–38.
20. Lima V V., Giachini FRC, Choi H, Carneiro FS, Carneiro ZN, Fortes ZB, et al. Impaired vasodilator activity in deoxycorticosterone acetate-salt hypertension is associated with increased protein O-GlcNAcylation. *Hypertension*. 2009;53(2):166–74.
21. Du XL, Edelstein D, Dimmeler S, Ju Q, Sui C, Brownlee M. Hyperglycemia inhibits endothelial nitric oxide synthase activity by posttranslational modification at the Akt site. *J Clin Invest*. 2001;108(9):1341–8.
22. Musicki B, Kramer MF, Becker RE, Burnett AL. Inactivation of phosphorylated endothelial nitric oxide synthase (Ser-1177) by O-GlcNAc in diabetes-associated erectile dysfunction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(33):11870–5.
23. Lima V V, Giachini FR, Hardy DM, Webb RC, Tostes RC. O-GlcNAcylation : a

- novel pathway contributing to the effects of endothelin in the vasculature. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2011;300(2):236–50.
24. Pantaleon M, Scott J, Kaye PL. Nutrient sensing by the early mouse embryo: Hexosamine biosynthesis and glucose signaling during preimplantation development. *Biol Reprod*. 2008;78(4):595–600.
25. Laczy B, Hill BG, Wang K, Paterson AJ, White CR, Xing D, et al. Protein O-GlcNAcylation: a new signaling paradigm for the cardiovascular system. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009;296(1):13–28.
26. Lima V V, Spitler K, Choi H, Webb RC, Tostes RC. O-GlcNAcylation and oxidation of proteins: is signalling in the cardiovascular system becoming sweeter ? *Clin Sci*. 2012;486:473–86.
27. Borghgraef P, Menuet C, Theunis C, Louis J V., Devijver H, Maurin H, et al. Increasing brain protein O-GlcNAc-ylation mitigates breathing defects and mortality of Tau.P301L mice. *PLoS One*. 2013;8(12):1–13.
28. Turco MY, Moffett A. Development of the human placenta. *Dev*. 2019;146(22):1–14.
29. Paria BC, Reese J, Das SK, Dey SK. Deciphering the cross-talk of implantation: advances and challenges. *Science (80-)*. 2002;296(5576):2185–8.
30. van den Brûle F, Berndt S, Simon N, Coulon C, Le Goarant J, Munaut C, et al. Trophoblast invasion and placentation: molecular mechanisms and regulation. *Chem Immunol Allergy*. 2005;88:163–80.
31. Caluwaerts S, Vercruysse L, Luyten C, Pijnenborg R. Endovascular trophoblast invasion and associated structural changes in uterine spiral arteries of the pregnant rat. *Placenta*. 2005;26:574–84.
32. Cross JC. Genetic insights into trophoblast differentiation and placental morphogenesis. *Semin Cell Dev Biol*. 2000;11(2):105–13.
33. Enders AC, Welsh AO. Structural interactions of trophoblast and uterus during hemochorial placenta formation. *J Exp Zool*. 1993;266(6):578–87.
34. Maltepe E, Bakardjiev AI, Fisher SJ, Maltepe E, Bakardjiev AI, Fisher SJ. The placenta: transcriptional, epigenetic, and physiological integration during development. *J Clin Invest*. 2010;120(4):1016–25.
35. Rai A, Cross JC. Development of the hemochorial maternal vascular spaces in the placenta through endothelial and vasculogenic mimicry. *Dev Biol [Internet]*.

- 2014;387(2):131–41. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2014.01.015>
36. Furukawa S, Kuroda Y, Sugiyama A. A comparison of the histological structure of the placenta in experimental animals. *J Toxicol Pathol.* 2014;27(1):11–8.
37. Coan PM, Ferguson-Smith AC, Burton GJ. Ultrastructural changes in the interhaemal membrane and junctional zone of the murine choriollantoic placenta across gestation. *J Anat.* 2005;207(6):783–96.
38. Soares MJ, Linzer DI. Rodent prolactin family and pregnancy. *Horseman;* 2001. 139–167 p.
39. Rossant J, Cross JC. Placental development: lessons from mouse mutants. *Nat Rev.* 2001;2(7):538–48.
40. Linzer DIH, Fisher SJ. The placenta and the prolactin family of hormones: Regulation of the physiology of pregnancy. *Mol Endocrinol.* 1999;13(6):837–40.
41. Cross JC, Hemberger M, Lu Y, Nozaki T, Whiteley K, Masutani M, et al. Trophoblast functions, angiogenesis and remodeling of the maternal vasculature in the placenta. *Mol Cell Endocrinol.* 2002;187(1–2):207–12.
42. Coan PM, Conroy N, Burton GJ, Ferguson-Smith AC. Origin and characteristics of glycogen cells in the developing murine placenta. *Dev Dyn.* 2006;235(12):3280–94.
43. Gasperowicz M, Otto F. The notch signalling pathway in the development of the mouse placenta. *Placenta.* 2008;29(8):651–9.
44. Adamson SL, Lu Y, Whiteley KJ, Holmyard D, Hemberger M, Pfarrer C, et al. Interactions between trophoblast cells and the maternal and fetal circulation in the mouse placenta. *Dev Biol.* 2002;250(2):358–73.
45. Herington JL, Bany BM. The conceptus increases secreted phosphoprotein 1 gene expression in the mouse uterus during the progression of decidualization mainly due to it's effects on uterine natural killer cells. *Reproduction.* 2007;133(6):1213–21.
46. Bany BM, Cross JC. Post-implantation mouse conceptuses produce paracrine signals that regulate the uterine endometrium undergoing decidualization. *Dev Biol.* 2006;294(2):445–56.
47. Austin KJ, Bany BM, Belden EL, Rempel LA, Cross JC, Hansen TR. Interferon-stimulated gene-15 (Isg15) expression is up-regulated in the mouse uterus in response to the implanting conceptus. *Endocrinology.* 2003;144(7):3107–13.

48. Blois SM, Klapp BF, Barrientos G. Decidualization and angiogenesis in early pregnancy: Unravelling the functions of DC and NK cells. *J Reprod Immunol* [Internet]. 2011;88(2):86–92. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jri.2010.11.002>
49. Cross JC, Werb Z, Fisher SJ. Implantation and the placenta: Key pieces of the development puzzle. *Science* (80-). 1994;266(5190):1508–18.
50. Clark SL, Cotton DB, Lee W, Bishop C, Hill T, Southwick J, et al. Central hemodynamic assessment of normal term pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*. 1989;161:1439–42.
51. Johnson RL, Gilbert M, Meschia G, Battaglia FC. Cardiac output distribution and uteroplacental blood flow in the pregnant rabbit: A comparative study. *Am J Obstet Gynecol*. 1985;151(5):682–6.
52. Sibai BM, Frangieh A. Maternal adaptation to pregnancy. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 1995;7:420–6.
53. Cipolla M, Osol G. Hypertrophic and hyperplastic effects of pregnancy on the rat uterine arterial wall. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 1994;171(3):805–11. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/0002-9378\(94\)90102-3](http://dx.doi.org/10.1016/0002-9378(94)90102-3)
54. Nelson SH, Steinsland OS, Johnson RL, Suresh MS, Gifford A, Ehardt JS. Pregnancy-induced alterations of neurogenic constriction and dilation of human uterine artery. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol*. 1995;268(4 37-4):1694–701.
55. Cooke C-LM, Davidge ST. Pregnancy-induced alterations of vascular function in mouse mesenteric and uterine Arteries. *Biol Reprod*. 2003;68(3):1072–7.
56. Xiao D, Pearce WJ, Zhang L. Pregnancy enhances endothelium-dependent relaxation of ovine uterine artery: Role of NO and intracellular Ca²⁺. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol*. 2001;281(1 50-1):183–90.
57. Wight E, Kung CF, Moreau P, Takase H, Bersinger NA, Luscher TF. Aging, serum estradiol levels, and pregnancy differentially affect vascular reactivity of the rat uterine artery. *J Soc Gynecol Investig*. 2000;7(2):106–13.
58. Gouloupoulou S, Hannan JL, Matsumoto T, Webb RC. Pregnancy reduces RhoA / Rho kinase and protein kinase C signaling pathways downstream of thromboxane receptor activation in the rat uterine artery. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2012;302:2477–88.
59. Everett TR, Lees CC. Beyond the placental bed: Placental and systemic determinants of the uterine artery Doppler waveform. *Placenta*.

- 2012;33(11):893–901.
60. Nelson SH, Steinsland OS, Wang Y, Yallampalli C, Dong Y, Sanchez JM. Increased nitric oxide synthase activity and expression in the human uterine artery during pregnancy. *Circ Res*. 2000;87:406–11.
61. Webster RP, Roberts VHJ, Myatt L. Protein nitration in placenta - Functional significance. *Placenta*. 2008;29(12):985–94.
62. Krause BJ, Hanson MA, Casanella P. Role of nitric oxide in placental vascular development and function. *Placenta*. 2011;32(11):797–805.
63. Bird IM, Zhang L, Magness RR. Possible mechanisms underlying pregnancy-induced changes in uterine artery endothelial function. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 284. 2003;284:245–58.
64. Helgadóttir H, Tropea T, Gizurarson S, Meiri H, Mandalà M. Aspirin causes endothelium-dependent vasodilation of resistance arteries from non-gravid and gravid rats. *Pregnancy Hypertens [Internet]*. 2019;15:141–5. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.preghy.2019.01.001>
65. Marshall SA, Senadheera SN, Jelinic M, O'Sullivan K, Parry LJ, Tare M. Relaxin deficiency leads to uterine artery dysfunction during pregnancy in mice. *Front Physiol*. 2018;9.
66. Lorca RA, Wakle-Prabakaran M, Freeman WE, Pillai MK, England SK. The large-conductance voltage- and Ca²⁺-activated K⁺ channel and its γ 1-subunit modulate mouse uterine artery function during pregnancy. *J Physiol*. 2018;596(6):1019–33.
67. Teixeira SAM. A importância do óxido nítrico na fisiopatologia da pré-eclâmpsia. *Femina*. 2006;34(8):565–70.
68. Schaan BD, Silva AMV, Iriogoyen MC. Disfunção endotelial no diabetes melito e estados de resistência à insulina: papel do estresse oxidativo e potenciais oportunidade terapêuticas. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2010;54(6):514–6.
69. Yang Y, Wu Z, Meininger CJ, Wu G. L-Leucine and NO-mediated cardiovascular function. *Amino Acids*. 2015;47(3):435–47.
70. Flora Filho R, Zilberstein B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. *Metabolismo, síntese e funções. Rev Ass Med Bras*. 2000;46(3):256–71.
71. Furchgott RF, Zawadzki J V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*.

- 1980;288(5789):373–6.
72. Púzserová A, Kopincová J, Bernátová I. The role of endothelium and nitric oxide in the regulation of vascular tone. *Ceskoslov Fysiol*. 2008;57(2–3):53–60.
73. Costa MA. The endocrine function of human placenta :an overview. *Reprod Biomed Online [Internet]*. 2016;32(1):14–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rbmo.2015.10.005>
74. Pang Y, Thomas P. Additive effects of low concentrations of estradiol-17 β and progesterone on nitric oxide production by human vascular endothelial cells through shared signaling pathways. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2017;165:258–67.
75. Pang Y, Dong J, Thomas P. Progesterone increases nitric oxide synthesis in human vascular endothelial cells through activation of membrane progesterone receptor- α . *Am J Physiol - Endocrinol Metab*. 2015;308(10):E899–911.
76. Song M, Bode AM, Dong Z, Lee M-H. AKT as a therapeutic target for cancer. *Cancer Res*. 2019;79(6):1–14.
77. Astuti Y, Nakabayashi K, Deguchi M, Ebina Y, Yamada H. Human recombinant H2 relaxin induces AKT and GSK3 β phosphorylation and HTR-8/Svneo cell proliferation. *J Med Sci*. 2015;61(1):E1–8.
78. Chung E, Yeung F, Leinwand LA. Akt and MAPK signaling mediate pregnancy-induced cardiac adaptation. *J Appl Physiol* 112. 2012;112:1564–75.
79. Lee J, Banu SK, Mccracken JA, Arosh JA. Early pregnancy modulates survival and apoptosis pathways in the corpus luteum in sheep. *Reproduction*. 2016;151:187–202.
80. Jackson ACW, Cotter TG. The synthetic progesterone Norgestrel is neuroprotective in stressed photoreceptor-like cells and retinal explants , mediating its effects via basic fibroblast growth factor , protein kinase A and glycogen synthase kinase 3 b signalling. *Eur J Neurosci*. 2016;43:899–911.
81. Li X, Zhang J, Chai S, Wang X. Progesterone alleviates hypoxic-ischemic brain injury via the Akt/GSK-3 β signaling pathway. *Exp Ther Med*. 2014;8(4):1241–6.
82. Kaasik K, Kivimäe S, Allen JJ, Chalkley RJ, Huang Y, Baer K, et al. Glucose sensor O-GlcNAcylation coordinates with phosphorylation to regulate circadian clock. *Cell Metab*. 2014;17(2):291–302.
83. Torres CR, Hart GW. Topography and polypeptide distribution of terminal N-acetylglucosamine residues on the surfaces of intact lymphocytes. Evidence for

- O-linked GlcNAc. *J Biol Chem*. 1984;259(5):3308–17.
84. Frank L a, Sutton-McDowall ML, Brown HM, Russell DL, Gilchrist RB, Thompson JG. Hyperglycemic conditions perturb mouse oocyte in vitro developmental competence via beta-O-linked glycosylation of heat shock protein 90. *Hum Reprod*. 2014;29(6):1292–303.
85. Yu SH, Boyce M, Wands AM, Bond MR, Bertozzi CR, Kohler JJ. Metabolic labeling enables selective photocrosslinking of O-GlcNAc-modified proteins to their binding partners. *Proc Natl Acad Sci*. 2012;109(13):4834–9.
86. Gao Y, Wells L, Comer FI, Parker GJ, Hart GW. Dynamic O-glycosylation of nuclear and cytosolic proteins: Cloning and characterization of a neutral, cytosolic Beta-N-acetylglucosaminidase from human brain. *J Biol Chem*. 2001;276(13):9838–45.
87. Hu P, Shimoji S, Hart GW. Site-specific interplay between O-GlcNAcylation and phosphorylation in cellular regulation. *FEBS Lett*. 2010;584(12):2526–38.
88. Hanover JA, Krause MW, Love DC. The hexosamine signaling pathway: O-GlcNAc cycling in feast or famine. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1800(2):80–95.
89. O'Donnell N, Zachara NE, Hart GW, Marth JD. Ogt-dependent X-chromosome-linked protein glycosylation is a requisite modification in somatic cell function and embryo viability. *Mol Cell Biol*. 2004;24(4):1680–90.
90. Federici M, Menghini R, Mauriello A, Hribal ML, Ferrelli F, Lauro D, et al. Insulin-dependent activation of endothelial nitric oxide synthase is impaired by O-linked glycosylation modification of signaling proteins in human coronary endothelial cells. *Circulation*. 2002;106(4):466–72.
91. Beleznai T, Bagi Z. Activation of hexosamine pathway impairs nitric oxide (NO)-dependent arteriolar dilations by increased protein O-GlcNAcylation. *Vascul Pharmacol*. 2012;56(3–4):115–21.
92. Pantaleon M, Tan HY, Kafer GR, Kaye PL. Toxic effects of hyperglycemia are mediated by the hexosamine signaling pathway and o-linked glycosylation in early mouse embryos. *Biol Reprod*. 2010;82(4):751–8.
93. Corvino SB, Volpato GT, Rudge MVC, Damasceno DC. Intrauterine Growth Restricted Rats Exercised before and during Pregnancy: Maternal and Perinatal Repercussions. *Hindawi*. 2015;2015:1–10.
94. Tai MM. A mathematical model for the determination of total area under glucose tolerance and other metabolic curves. *Diabetes Care*. 1994;17(2):152–

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

4.

7. ANEXO (S)

7.1 Anexo 1 – Comitê de ética artigo 1



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



CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo Nº 23108.120946/2015-83, sobre “Avaliação de N-acetil glucosamina (O-GlcNAc) em tecido placentário”, sob a responsabilidade de **Profª Drª FERNANDA REGINA CASAGRANDE GIACHINI VITORINO/Vanessa Dela Justina & Col.**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)-UFMT em reunião ordinária de **04/03/2016**.

CERTIFICATE

We certify that the protocol Nº 23108.120946/2015-83, entitled “N-acetyl glucosamine (O-GlcNAc) expression in placental tissue”, is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in the Use of Animals (Federal University of Mato Grosso – UFMT) on **Mar 04, 2016**.

Cuiabá-MT, 07 de março de 2016.

Prof. Dr. Roberto Vilela Veloso
Presidente

Prof. Dr. Daniel Moura de Aguiar
Vice-Presidente

7.2 Anexo 2 – Comitê de ética artigo 2



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



CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo Nº 23108.902445/2018-61, sobre “Influência da O-Glicosilação com N-acetilglucosamina (O-GlcNAc) na função vascular da artéria uterina de ratas durante a prenhez”, sob a responsabilidade de **Profa. Dra. Fernanda Regina C. G. Vitorino**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)-UFMT em reunião ordinária de **27/04/2018**.

CERTIFICATE

We certify that the protocol Nº23108.902445/2018-61, entitled “Influence of O-linked N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) on the vascular function of the uterine artery from rats during pregnancy”, is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in the Use of Animals (Federal University of Mato Grosso – UFMT) on **April, 2018**.

Cuiabá-MT, 27 de abril de 2018.

Prof. Dr. Daniel Moura de Aguiar
Presidente

Profa. Dra. Suélem Aparecida de França
Vice-Presidente

Universidade Federal de Mato Grosso – UFMT
Cidade Universitária – Av. Fernando Correa da Costa, 2.367
Bairro Boa Esperança – CEP 78060-900 – CUIABÁ-MT, Brasil.

Telefone: (65) 3615 8829
Fax.: (65) 3615 8254
E-mail: cepa@ufmt.br

7.3 Anexo 3 – Preparo de soluções

- Tampão Citrato 0,1 M

Solução A: Ácido cítrico (10,5 g dissolvido em 500 mL de H₂O destilada)

Solução B: Citrato de sódio (14,7 g dissolvido em 500 mL de H₂O destilada)

Para preparar 500 mL de tampão citrato 0,1 M, combinar 450 mL de H₂O destilada com 9 mL da solução A e 41 mL da solução B. Ajustar pH para 6,5.

- Tampão de Amostra

Glicerol 50% (15 mL), DTT 250 mM (1,1157 g), Tris 1 M (9,375 mL), Azul de Bromofenol 0,02% (3 mg), H₂O milli-Q: q.s.p. 30 mL, pH 6,8.

- Gel de Corrida

Acrilamida/Bis solution 30%, 37,5:1 (Bio-Rad) (12,5 mL), Tris HCl 1.5 M, pH 8.8 (16,6 mL), Persulfato de Amônio 10% (500 µL), TEMED – (Pro-Pure) (20 µL), H₂O (20 mL).

- Stacking Gel

Acrilamida/Bis solution 30%, 37,5:1 (Bio-Rad) (2 mL), Tris HCl 0.5 M, pH 8.8 (15,2mL), Persulfato de Amônio 10% (120 µL), SDS 10% (120 µL), TEMED – (Pro-Pure) (12 µL), H₂O milli-Q (8,4 mL).

- Tampão de Eletroforese 10X – 1L

Tris 250 mM (30,3 g), Glicina 1,92 M (144,1 g), SDS 1% (10 g), pH 8,3-8,4.

- Tampão de Transferência 10X – 1L

Tris 250 mM (30,3 g), Glicina 1,92 M (144,1 g), pH 8,3-9,3.

- TBS-T 10X – 1L

NaCl 1,6 M = 93,50 g, Tris 0,2 M = 24,23 g ou 200 mL de Tris 1M, pH 7,5.

- Tampão Fosfato Salino (PBS) 1 M – 0,5 L

NaCl (43,95 g), KH₂PO₄ (1,37 g), Na₂HPO₄ (5,675 g), pH 7,2-7,4.