

EL PAPEL DE LA O-GLcNACILACIÓN EN EL ESTRÉS OXIDATIVO Y LA DISFUNCIÓN ENDOTELIAL*

Berenice Fernández-Rojas, Jesús Hernández-Juárez, Itandehui Belem Gallego-Velasco, Luis Miguel García-Cruz y Pedro Antonio Hernández-Cruz*

¹Laboratorio de Genómica, Proteómica y Glicobiología del Cáncer. Centro de Investigación, Facultad de Medicina UABJO-UNAM. Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca, Oaxaca de Juárez, Oaxaca, México

*Autor de correspondencia correo E: fuegoblanco186@yahoo.com.m

RESUMEN

La unión a O N-acetil- β -D-glucosamina-glicosilación u O-GlcNacilación (O-GlcNAc) es una modificación postraduccional que consiste en la adición de N-acetil- β -D-glucosamina (GlcNAc) a residuos de serinas y treoninas en las proteínas. Sus efectos en las células son duales, sin embargo, cuando esta modificación de proteínas se expresa crónicamente, como sucede en respuesta a la hiperglucemia de los pacientes con diabetes mellitus, sus efectos tienden a ser adversos, siendo uno de sus blancos las células endoteliales. Debido a que la disfunción endotelial es causada tanto por la O-GlcNAc como por el estrés oxidativo, se ha llegado hipotetizar que ambos procesos están interrelacionados, y que probablemente, sea la O-GlcNAc la responsable de los efectos adversos del estrés oxidativo en el endotelio. Nrf2 podría ser una pieza clave en la relación O-GlcNAc - estrés oxidativo en la disfunción endotelial, ya que en primer lugar, este factor de transcripción controla la expresión basal e inducción de enzimas antioxidantes, y recientemente, se ha demostrado que su actividad podría estar regulada por la O-GlcNAc. Por lo tanto, esta revisión describe las investigaciones más recientes sobre la función de la O-GlcNAc en el endotelio y propone a la inactivación de Nrf2 como un factor importante en el desarrollo de la disfunción endotelial.

ABSTRACT

O-linked N-acetyl- β -D-glucosamine glycosylation or O-GlcNacylation (O-GlcNAc) is a post-translational modification consisting on the addition of N-acetyl- β -D-glucosamine (GlcNAc) to serine and threonine residues in proteins. Its effects on cells are dual, however, when this modification is expressed chronically, as happens in response to hyperglycemia in patients with diabetes mellitus, its effects tend to be adverse, one of its targets being endothelial cells. Because endothelial dysfunction is caused by both O-GlcNAc and oxidative stress, it has been hypothesized that both processes are interrelated, and that O-GlcNAc is probably responsible for the adverse effects of oxidative stress in endothelium. Nrf2 could be a key piece in the O-GlcNAc-oxidative stress relationship in endothelial dysfunction, since, in the first place, this transcription factor controls the basal expression and induction of antioxidant enzymes, and recently, it has been demonstrated that its activity could be regulated by O-GlcNAc. Therefore, this review describes the most recent investigations on the role of O-GlcNAc in the endothelium and proposes the inactivation of Nrf2 as an important factor in the development of endothelial dysfunction.

PALABRAS

CLAVE:

O-GlcNAc, Estrés oxidativo, Nrf2, Endotelio.

KEY WORDS:

O-GlcNAc, Oxidative stress, Nrf2, Endothelium.

O-GLcNACILACIÓN

La O-acetilglucosaminilación (O-GlcNAcilación), es una modificación reversible post-traducciona de proteínas, donde el carbohidrato N-Acetil glucosamina (GlcNAc), proveniente de la vía biosintética de las hexosaminas (VBH), se adiciona a los residuos hidroxilo de serinas y treoninas de diversas proteínas citoplasmáticas, nucleares, mitocondriales y de membrana plasmática (1, 2). La UDP-GlcNAc es el producto del flujo de nutrientes a través de la VBH que integra a la glucosa, la glutamina y al acetil CoA que puede provenir del metabolismo de los ácidos grasos y el uridin trifosfato (UTP). Se ha propuesto que la UDP-GlcNAc funciona como un sensor de nutrientes y de estrés que regula procesos celulares de transcripción, transducción de señales, modificaciones epigenéticas y el metabolismo (2).

La UDP-GlcNAc es un sustrato para la enzima O-GlcNAc transferasa (OGT), que cataliza la transferencia de residuos de GlcNAc a los grupos hidroxilos de residuos de serinas y treoninas, mientras

que la enzima O-GlcNAcasa (OGA) que cataliza la hidrólisis del azúcar que se ha unido a las proteínas (Fig. 1) además, sirve de adaptador de la enzima OGT para formar el complejo O-GlcNAc-enzima (2, 3). Se ha propuesto que la disponibilidad de nutrientes no solo regula los niveles de O-GlcNAc sino que también modula los niveles de las enzimas OGT y OGA (2). Incluso se cree que ambas enzimas auto modulan su actividad y estabilidad.

La O-GlcNAcilación es análoga a la fosforilación ya que puede regular la actividad, controlar la estabilidad, interacción y función de la proteína diana. La O-GlcNAcilación de un aminoácido puede facilitar o impedir la fosforilación de otro. Además puede existir una competencia, ya que el mismo aminoácido puede ser fosforilado u O-GlcNAcilado.

La O-GlcNAcilación puede regular la respuesta celular a hormonas como la insulina, iniciar la respuesta contra el estrés, modular la capacidad de una célula para crecer y dividirse; es esencial para la viabilidad celular, el desarrollo embrionario, el transporte celular y para la transcripción génica, entre otras (4, 5).

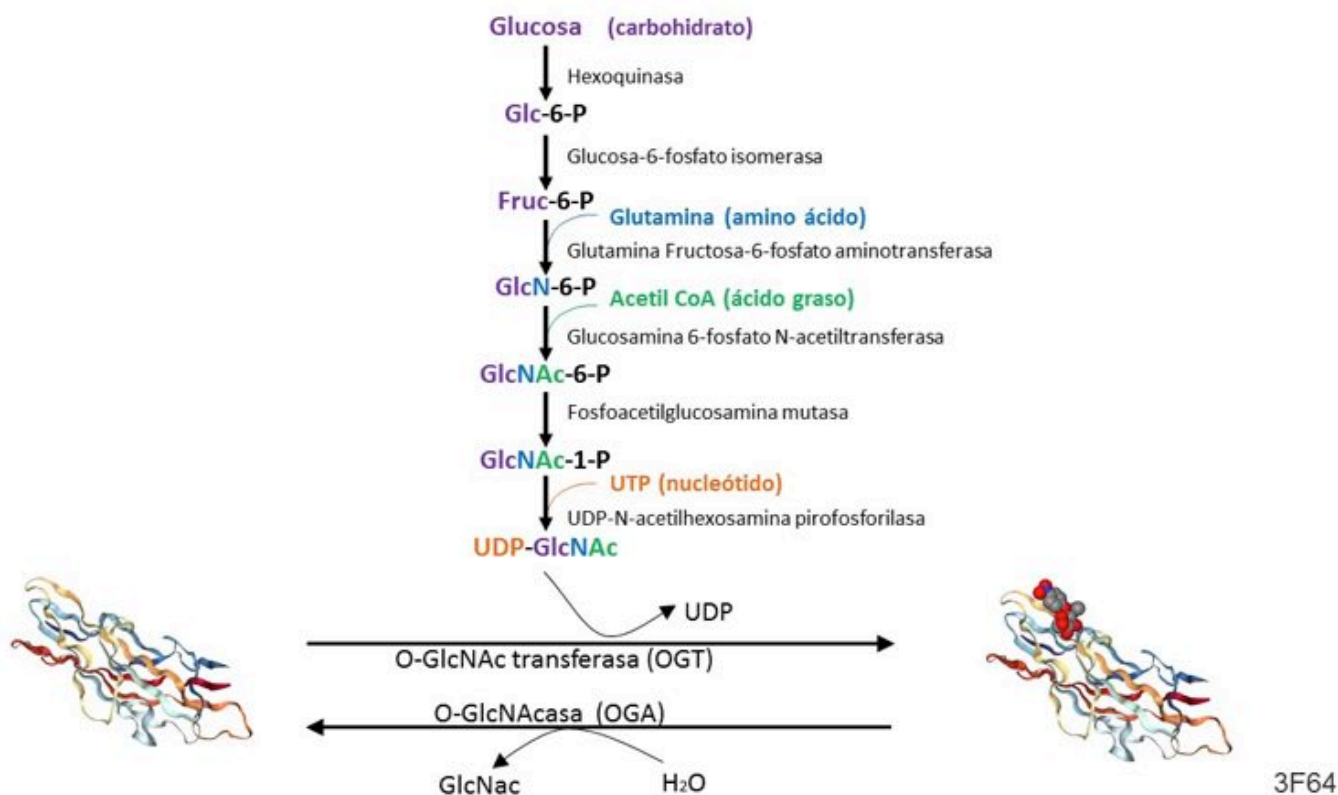


Figura 1. La vía biosintética de las hexosaminas. Esta vía involucra el metabolismo de diferentes biomoléculas, como aminoácidos (en azul), ácidos grasos (en verde) y nucleótidos (anaranjado) que culminan en la producción de UDP-GlcNAc el cual es el sustrato donador para la O-GlcNAcilación. El ciclo lo realizan dos enzimas, la OGT (O-GlcNAc transferasa) que adiciona el GlcNAc al UDP-GlcNAc a los residuos de serinas y treoninas de las proteínas, la otra enzima, la OGA (O-GlcNAcasa) hidroliza la adición del azúcar. La proteína O-GlcNAcilada que se coloca en la figura, es el dominio de lectina unido a GlcNAc tomado del banco de datos de proteínas (PDB ID:3F64)(47).

Existe evidencia de que el incremento de los niveles de O-GlcNAcilación protege del daño celular y mejora la supervivencia celular (6). Ejemplos de ello son los que se describen brevemente a continuación. La presencia de mutaciones en queratina 8 y 18 (K8 y K18) predisponen a los individuos a padecer enfermedad hepática al proteger a los hepatocitos de la apoptosis. En relación a esto, se ha demostrado que la O-GlcNAcilación de K18 en tres residuos de serina (30/31/49) es trascendental para el funcionamiento hepático ya que promueve la fosforilación y activación de cinasas de supervivencia celular. En un modelo experimental con ratones transgénicos, los cuales fueron suprimidos de la glicosilación en los sitios antes mencionados, se pudo comprobar que bajo estas condiciones los animales son más susceptibles a desarrollar daño hepático y pancreático, así como apoptosis en comparación con ratones utilizados como control (8). Otros investigadores han demostrado que la O-GlcNAcilación protege contra la pérdida de células neuronales, ya que en ratones transgénicos JNPL3 tau homocigotos tratados con un inhibidor de la enzima que remueve los residuos de GlcNAc de las proteínas, la O-GlcNAcase (OGA), se incrementa la O-GlcNAcilación de tau (proteína asociada a patologías neurodegenerativas), lo que previene la formación de agregados de tau y disminuye la muerte de células neuronales (8). Otro ejemplo fue el realizado en ratas macho sometidas a laparotomía de la línea media. Las ratas fueron sangradas hasta una presión arterial de 40 mmHg por 90 min y posteriormente fueron resucitadas con lactato de Ringer. La administración de glucosamina (GlcN), durante la resucitación, mejoró el gasto cardiaco al doble en comparación al grupo control. La administración de GlcN promovió la O-GlcNAc de proteínas de riñón y cerebro, mejorando el flujo sanguíneo de ambos órganos. Por lo tanto, la O-GlcNAc mejora la recuperación de la función cardiaca, la perfusión de órganos y en la regulación de los niveles de citocinas inflamatorias (9, 10).

El incremento en los niveles de O-GlcNAcilación de proteínas, puede ser inducido adicionando GlcN exógena, la cual entra a la célula y se incorpora a la VBH. La GlcN posee propiedades anti-inflamatorias en varios modelos *in vivo* de artritis reumatoide, también protege del daño a arterias por angioplastias y del daño cardiaco por isquemia-reperfusión (11).

Paradójicamente, otros estudios han sugerido que el incremento de O-GlcNAc está asociada a diferentes enfermedades como el cáncer, diabetes, resistencia a la insulina, glucotoxicidad, enfermedades neurodegenerativas, disfunciones cardia-

cas asociadas al estrés oxidante y la inflamación (12-14).

Los mecanismos de los efectos protectores o dañinos del incremento de la O-GlcNAcilación aún no han sido descritos. Sin embargo, algunos autores sugieren que el tiempo de exposición es el factor clave. La O-GlcNAcilación de proteínas aguda, presenta efectos aparentemente benéficos, sin embargo cuando se convierte en crónica, puede conllevar a problemas en la salud.

ENDOTELIO

El endotelio es la capa celular que recubre internamente los vasos sanguíneos. Las células endoteliales forman una monocapa que tapiza todo el sistema vascular. Se caracterizan por una morfología alargada (30 μm de largo, 12 μm de ancho y 0.3 μm de alto) y una polaridad apical-basal, que se traduce en una distribución asimétrica de sus funciones. Ello les permite secretar distintas proteínas y mediadores químicos hacia la matriz extracelular (exterior de los vasos) y hacia el torrente sanguíneo (interior de los vasos). Desarrolla múltiples funciones que no solo incluyen servir de conducto para la sangre, sino que participa arduamente con el sistema inmunológico y la homeostasia, así como en la regulación del tono vascular. El endotelio sintetiza vasodilatadores como el NO (óxido nítrico) y prostaciclina (PGI_2), moléculas que además funcionan como agentes antiplaquetarios. Pero también sintetiza sustancias vasoconstrictoras como la endotelina 1 y la angiotensina II cuando el organismo así lo requiere (15). Su contribución a la homeostasia se da por la síntesis de sustancias procoagulantes y anticoagulantes. En condiciones normales, el endotelio posee un fenotipo anticoagulante que mantiene en todo momento la sangre líquida en el interior de los vasos sanguíneos, el cual está dado por la expresión de antitrombina, trombosmodulina, receptor de la proteína C anticoagulante y del activador tisular del plasminógeno 1 (PAI-1). La liberación del NO y la PGI_2 del endotelio también forma parte de este fenotipo. De forma opuesta, el endotelio se torna procoagulante cuando este es activado o es disfuncional. La disfunción endotelial se define como la pérdida de las funciones normales endoteliales que causan vasoconstricción, trombosis y aumento en la secreción de citocinas y quimiocinas, así como en la adherencia leucocitaria (16).

El estudio de la disfunción endotelial requiere de la cuantificación de diversos marcadores. Aunque se reconocen diversas moléculas para este fin, éstos no son exclusivos del endotelio, además de que sus niveles no sólo reflejan la disfunción de las células

endoteliales, sino que también su activación o la presencia de una lesión celular. Entre estos marcadores se encuentran : el factor de von Willebrand (VWF), PAI-1, molécula de adhesión endotelial de leucocitos tipo 1 (ELAM-1), molécula de adhesión de células vasculares tipo 1 (VCAM-1), molécula de adhesión intercelular tipo 1 (ICAM-1), molécula de adhesión celular de plaquetas al endotelio tipo 1 (PECAM-1), P-selectina, factor tisular (TF), tromboomodulina (TM), interleucina 6, interleucina 8, NO, entre otras (17). Recientemente, se ha descrito que la O-GlcNAcilación y la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) contribuyen a la disfunción endotelial (18).

ESTRÉS OXIDATIVO

Se define como el desequilibrio entre el sistema antioxidante y la producción de especies reactivas del oxígeno (ERO) y radicales libres (RL). Este desequilibrio puede ser provocado por un aumento en la producción de estos o bien, a la reducción de la actividad o transcripción de enzimas antioxidantes, o una combinación de estos factores.

Las ERO pueden producirse durante la reducción univalente del oxígeno, se forman tras la adición de un electrón a una molécula de oxígeno produciendo a su vez especies parcialmente reducidas que pueden reaccionar para producir otras ERO (Fig. 2). Este término involucra no solo a los RL derivados del oxígeno como el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroxilo (OH^{\cdot}), peróxido (ROO^{\cdot}) o alcoxilo (RO^{\cdot}), sino también a los que no son radicales libres como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el ozono (O_3). La producción excesiva de ERO y RL conlleva al daño a biomoléculas como el ADN, bases nitrogenadas, proteínas y lípidos que en conjunto ocasionan daño celular y/o tisular (19, 20). Se ha asociado el estrés oxidativo a enfermedades como Alzheimer, diabetes, cáncer, aterosclerosis, enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas, entre otras (21).

Las principales fuentes de producción de especies reactivas del oxígeno son: la cadena de transporte de electrones en la mitocondria, enzimas como la NADPH oxidasa (Nox), NADH oxidasa, óxido nítrico sintasa (NOS), xantina oxidasa, factores ambientales, humo de cigarro, fármacos, radiaciones, luz solar, entre muchas otras (22).

Para protegerse de los daños de las ERO, las células poseen un sistema antioxidante para contrarrestar estos efectos. Como las enzimas antioxidantes: superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx), o antioxidantes no enzimáticos como el glutatión (GSH), los flavonoides, las vitaminas o factores de transcripción. Esto permite mantener un balance oxidativo o un estado redox entre los agentes oxidantes y los antioxidantes. El regulador maestro de la respuesta antioxidante es el factor de transcripción relacionado al factor nuclear eritroide 2 (Nrf2).

NRF2

Es un factor de transcripción que se encuentra en la mayoría de los tejidos, siendo más abundante en el cerebro, hígado, riñón, piel y tracto gastrointestinal (23). Nrf2 induce la transcripción de genes citoprotectores de fase 2 que inducen proteínas asociadas a la eliminación de compuestos tóxicos y a algunas enzimas que promueven o tienen actividad antioxidante. Como en el caso de las enzimas γ -glutamato cisteína ligasa, glutatión reductasa, GPx, CAT, SOD y otras.

De manera general, en condiciones basales, la proteína keap1 (rica en residuos de cisteínas) y culina 3 (cul3) forman un complejo reprimiendo a Nrf2 en el citoplasma, adicionándole ubiquitina para su degradación por vía proteosomal, con una vida media de 20 minutos, resultando niveles bajos de Nrf2 en diversas células (24) (Fig. 3). En condiciones oxidantes, agentes electrófilos u otros inductores que desestabilizan y modifican los residuos

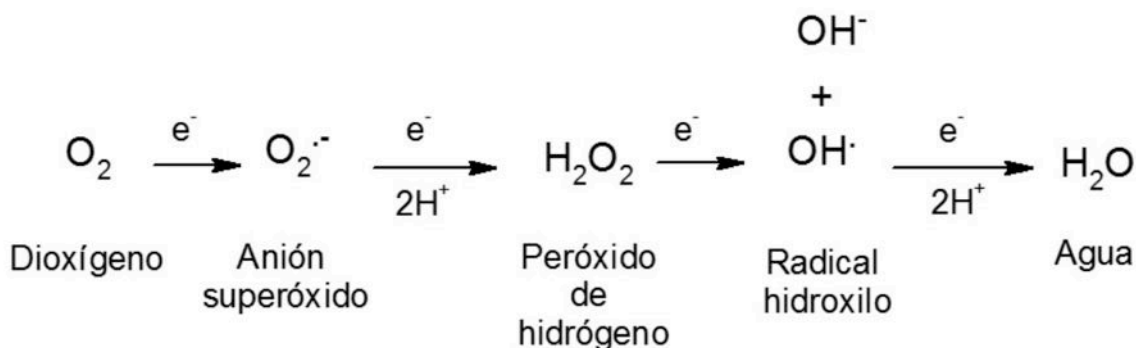


Figura 2. Formación de especies reactivas del oxígeno (ERO) por la reducción univalente del oxígeno.

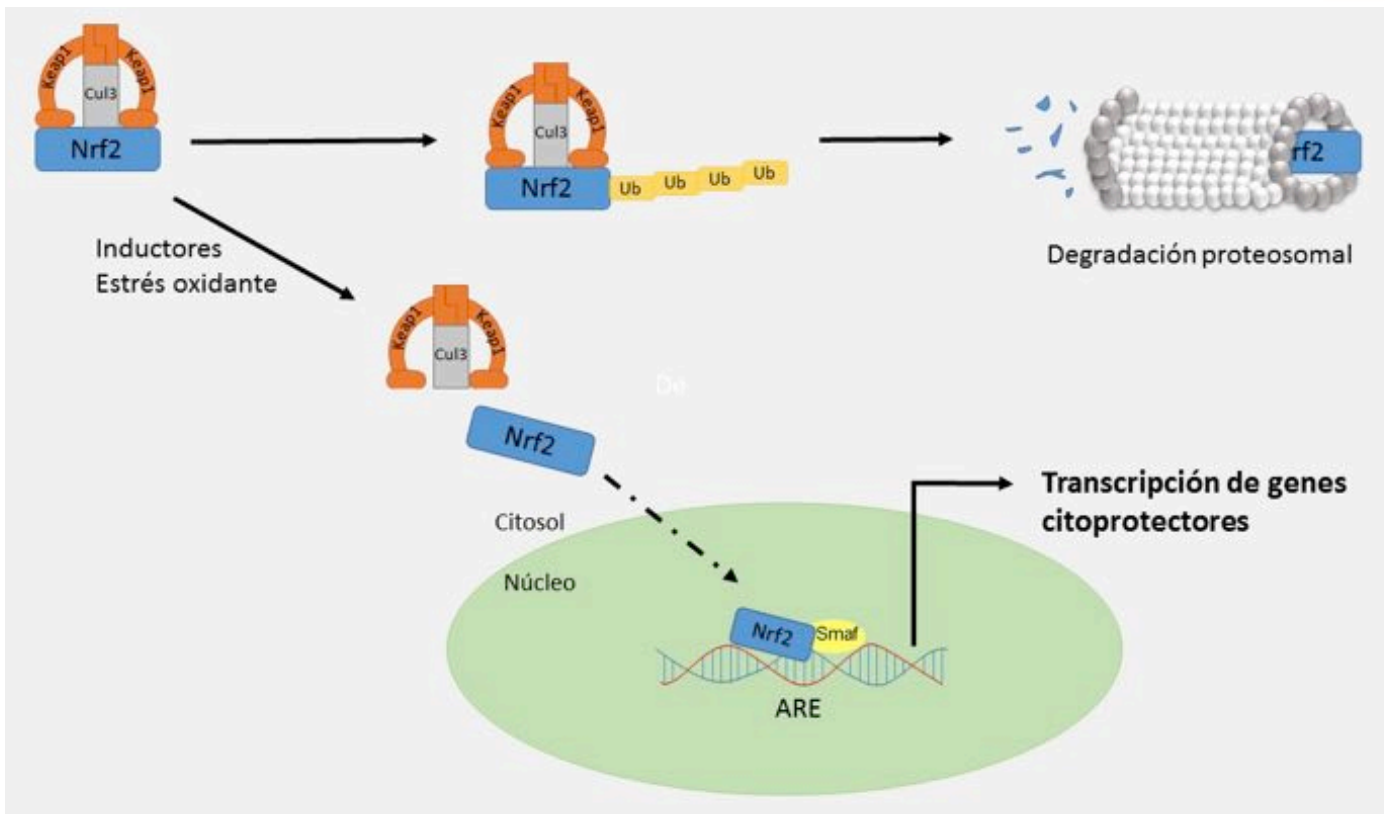


Figura 3. Mecanismo de acción de Nrf2. En condiciones basales, el factor de transcripción Nrf2 se encuentra en el citoplasma con su represor Keap 1 y Cul 3, lo que permite que se ubiquitine y posteriormente se degrade proteosomalmente. Bajo situación de estrés o inductores, Nrf2 se separa de su represor Keap 1 y se transloca al núcleo, uniéndose a la secuencia elementos de respuesta antioxidante (ARE) que permiten la transcripción de genes citoprotectores.

de cisteína de keap1 liberan a Nrf2 de su represor. Permitiendo que Nrf2 se transloque y acumule en el núcleo, uniéndose a la secuencia de elementos de respuesta antioxidante (ARE), secuencia río arriba de la región promotora de ciertos genes citoprotectores activando la transcripción de genes responsables de la detoxificación, actividad antioxidante y metabolismo (23). A la vez, Nrf2 inhibe la activación de la expresión de genes pro-oxidantes.

Nrf2 es una señal de supervivencia celular ya que su activación confiere protección contra diversos agentes dañinos reestableciendo la homeostasis intracelular redox (25, 26). En este sentido, la activación de Nrf2 podría ser importante en el tratamiento o prevención de enfermedades neurodegenerativas, cardiovasculares, complicaciones pulmonares y cáncer, donde el estrés oxidativo tiene un papel importante en su desarrollo.

O-GLcNACILACION DE PROTEINAS Y EL ESTRÉS OXIDATIVO EN CÉLULAS ENDOTELIALES

La hiperglucemia y la GlcN aumentan la generación de ERO induciendo estrés oxidante y disminuyendo

la expresión de enzimas antioxidantes (27, 28). A pesar de estos antecedentes, son escasos los estudios que han abordado la relación existente entre la O-GlcNAC, la producción de ERO y el estrés oxidante en células endoteliales, (Tabla 1).

La hiperglucemia y la GlcN incrementan la producción de $O_2^{\bullet-}$ mitocondrial y la O-GlcNACilación de NOS endotelial (eNOS) lo que conlleva a la disminución del 67% de su actividad en células endoteliales de aorta bovina (BAEC) (28). Estos resultados sugieren que la O-GlcNACilación podría generar disfunción endotelial al disminuir la producción de NO.

La GlcN también modula la activación endotelial, al incrementar la producción de ERO y al suprimir la activación celular endotelial determinada por la proteína-1 quimioatrayente de monocitos (MCP1) e ICAM-1 inducidos por TNF (factor de necrosis tumoral)- α en células endoteliales de venas umbilicales humanas (HUVEC) (14, 29). En otro estudio, la GlcN incrementa de manera concentración dependiente los niveles de expresión de PAI-1, la activación de p-38 en células HUVEC y en segmentos de aorta incrementa la producción del radical

TABLA 1
Resumen de los estudios *in vitro* de O-GlcNAc y la producción de ERO en el endotelio

Línea celular	Tratamiento	Principales hallazgos	Referencia
BAEC	Glucosa 5 y 30 mM, GlcN 5 o 10 mM en presencia o ausencia de oligonucleótidos de GFAT.	La hiperglucemia y la GlcN: <ul style="list-style-type: none"> • inhiben la actividad de eNOS (67%). • Incrementan la producción de $O_2^{\bullet-}$. • ↑ O-GlcNAcilación al doble (solo la glucosa). 	(28)
HUVEC	Pre-incubación por 2 h con GlcN 0.1-10 mM, o GlcNAc 1 y 10 mM y se estimularon con TNF- α 0.5 ng/ml durante 24 h. Alternativamente, las células se pre-incubaron por 2 h con SB203580 (5-20 μ M) y BMS-345541 (1-4 μ M) y posterior estimulación con TNF- α .	La GlcN suprime: <ul style="list-style-type: none"> • Expresión de ICAM-1 y MCP-1 inducida por TNF-α. • Mediante p38MAPK y NF-κB por modificaciones O-GlcNAc. 	(29)
HUVEC	Pre-incubación con 0.1 o 0.5 mmol/L de GlcN por cuatro días y posterior con GlcN con FBS (1%) durante 5 h y posterior estimulación con TNF- α (1 ng/ml) por 24 h adicionales.	La GlcN: <ul style="list-style-type: none"> • Inhibe la expresión de ICAM-1. • induce la generación de $O_2^{\bullet-}$. El incremento de O-GlcNAc ejerce ciertos efectos antiinflamatorios acompañados de propiedades pro oxidativas.	(14)
HUVEC	GlcN 5 mmol/L y TNF- α 1 ng/ml por 24 h o pre-incubadas 1 h con PD98059, inhibidor de MEK; SB203580, inhibidor de p38 o SP600125, inhibidor de JNK.	<ul style="list-style-type: none"> • GlcN ↑PAI-1. • GlcN+TNF-α ↑↑↑PAI-1. • Activación transitoria de p38. • La estimulación de PAI-1 se inhibe únicamente por SB203580. 	(30)
HRECs	Glucosa (5 mM) o con PUGNAc (200 μ M) por 12 h y posterior co-incubación con glioxal (500 μ M) por 24 h. Además de utilizar ARN de interferencia para OGT.	<ul style="list-style-type: none"> • El aumento de O-GlcNAc tuvo efectos citoprotectores • ↑ERO al ↑ la expresión de genes antioxidantes. • Evita la disipación del potencial de membrana mitocondrial. • Previene la apoptosis. 	(31)
HUVEC	GlcN 15 mM en presencia o ausencia de quercetina 5, 10, 20 y 50 μ M por 24 h.	La quercetina previene: <ul style="list-style-type: none"> • La apoptosis inducida por GlcN. • La disfunción endotelial (ICAM-1 y ET-1). • La expresión de VCAM-1, CHOP, GRP78, pJNK, pERK y caspasa 3 inducidos por GlcN. Además <ul style="list-style-type: none"> • Mejora la viabilidad celular • Inhibe la expresión de factores pro-inflamatorios. 	(32)
HUVEC	Glucosa (33 mM) por 24-48 h en presencia o ausencia de ácido ascórbico (100 μ M) o de quercetina sulfatada/glucurónido (100 nM, 300 mM y 1 μ M).	El sulfato de quercetina/glucurónido: <ul style="list-style-type: none"> • Inhibe la apoptosis inducida por la glucosa de manera dependiente de la concentración. • O el ácido ascórbico previenen la producción de H_2O_2, la inhibición de JNK y la actividad de la caspasa-3. 	(33)
HUVEC	Glucosa 5 y 20 mmol/L o concentraciones alternadas cada 24 h en presencia o ausencia de inhibidores de la PKC (BIMI-I; 5 μ Mol/L), PKC- β específico (LY379196; 30 nmol/L) y cloruro de porfirina MnSOD mimético Mn (III) tetrakis (ácido 4-benzoico) (MnTBAP; 100 μ mol / l).	La glucosa: <ul style="list-style-type: none"> • ↑ nitrotirosina, 8-hidroxideoxiguanosina, apoptosis, Nox y PKC. La glucosa en altas concentraciones: <ul style="list-style-type: none"> • ↑↑↑ nitrotirosina, 8-hidroxideoxiguanosina, apoptosis, Nox y PKC. Se normaliza con el uso de los inhibidores y de MnTBAP	(34)

HUVEC	Glucosa 5 o 33 mM (1–48 h). En presencia o ausencia de vitamina C (100 μ M), SNP (10 μ M- 1 mM, donador de NO), L-NAME (100 μ M, inhibidor NOS), PDTC (10 μ M, inhibidor de NF- κ B), wortmannin (100 nM, inhibidor de PI3K) y LY 294002 (10 μ M, inhibidor de PI3K).	La glucosa en concentraciones altas: <ul style="list-style-type: none"> • Induce apoptosis la cual se incrementó con los inhibidores de PI3K, NOS y el oligonucleótido antisentido de eNOS. • Y PDTC y SNP reducen notablemente la apoptosis. • Activa NF-κB. • Y la Vitamina C evita la fosforilación transitoria de Akt. • Atenua eNOS por los inhibidores de PI3K. 	(35)
Cultivo primario de aorta y VSMCs	Vehículo (metanol) o PUGNAc 100 μ M, en presencia o ausencia de apocinina (100 μ M, inhibidor de Nox) o Tiron (100 μ M, atrapador de $O_2^{\bullet-}$) por 6, 12 o 24 h.	El tratamiento con PUGNAc: <ul style="list-style-type: none"> • \uparrow O-GlcNAc. • \uparrow la producción de ERO y de $O_2^{\bullet-}$ • \uparrow Nox 1 y 4. • \downarrow la relajación dependiente del endotelio. 	(18)

Dónde: Akt: proteína quinasa B; EBP: proteína homóloga; eNOS: óxido nítrico sintasa endotelial; ERO: especies reactivas de oxígeno; ERK1/2: quinasa regulada por señales extracelulares 1/2; FBS: suero bovino fetal; GFAT: glutamina fructosa-6- fosfato aminotransferasa; GlcN: glucosamina; VBH: vías de las hexosaminas; H_2O_2 : peróxido de hidrógeno; ICAM-1: molécula de adhesión intercelular 1; JNK: quinasas c-Jun N-terminal; L-NAME: N(ω)-nitro-L-arginina metil éster; MCP-1: proteína quimioatrayente de monocitos 1; MnSOD: manganeso superóxido dismutasa mitocondrial; MnTBAP: ácido 4-benzoico porfirina de manganeso; NADPH: Nicotinamida-Adenina-Dinucleótido-Fosfato; NF- κ B: factor de transcripción nuclear kappa B; Nox: NADPH oxidasa; OGT: O-GlcNAc transferasa; $O_2^{\bullet-}$: anión superóxido; PDTC: ditiocarbamato de pirrolidina; PI3K: fosfoinositol 3-quinasa; PKC: proteína quinasa C; PUGNAc: O- (2-acetamido-2-desoxi-D-glucopiranosilidenamino) N-fenilcarbamato, SNP: nitroprusiato de sodio; TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa; VCAM-1: molécula de citoadhesión vascular-1.

$O_2^{\bullet-}$ y disminuye la producción de NO inducido por TNF- α (30).

Otros investigadores se han dado la tarea de investigar la asociación entre la O-GlcNAcilación y ERO en células endoteliales de microvasculatura de retina humana (HRECs). En estas células el incremento de la O-GlcNAcilación presentó efectos citoprotectores al reducir la producción de ERO y al incrementar la expresión de las enzimas antioxidantes SOD y GPx. Además previene la disipación del potencial de membrana mitocondrial y la apoptosis. El entendimiento de los mecanismos involucrados en la O-GlcNAc y la producción de ERO en células HREC ayudaría a entender los efectos tempranos de la O-GlcNAcilación en el desarrollo de retinopatía diabética. Por lo tanto, la regulación de la O-GlcNAcilación podría ser una alternativa en el tratamiento de enfermedades relacionadas con la hiperglucemia (31).

Por otra parte, también se han realizado estudios con compuestos antioxidantes. El flavonoide quercetina previene: la reducción de la viabilidad, muerte por apoptosis, el incremento en la concentración de marcadores de disfunción endotelial inducidos por concentraciones altas de GlcN en células HUVEC (32). Los resultados derivados de esa investigación sugieren que la quercetina previene la inflamación

y el estrés del retículo endoplásmico. Quizás el uso de flavonoides como la quercetina, podrían ser un auxiliar terapéutico contra la inflamación y la muerte por apoptosis inducida por la GlcN. Por otra parte, se ha demostrado que tanto quercetina sulfatada/glucoronido (el metabolito de quercetina tras metabolizarse) y el ácido ascórbico, previenen de la apoptosis y la producción de ERO inducida por concentraciones altas de glucosa en células HUVEC (33).

La exposición continua o discontinua de concentraciones altas de glucosa, también ha sido evaluada. La exposición intermitente estimula la sobre producción de ERO mediante la activación de Nox y la proteína cinasa C (PKC) induciendo la muerte celular por apoptosis y el incremento de marcadores de daño por estrés oxidativo en células HUVEC. En comparación con la exposición constante de glucosa, las exposiciones intermitentes resultaron más peligrosas, sugiriendo que los picos elevados de glucosa en diabéticos podrían generar daño endotelial (34).

Actualmente se conoce que en células HUVEC, el contenido alto de glucosa activa las vías de señalización PI3k/Akt/eNOS/NOS como protección a la apoptosis temprana. Además, la producción excesiva y/o prolongada de ERO induce la activación

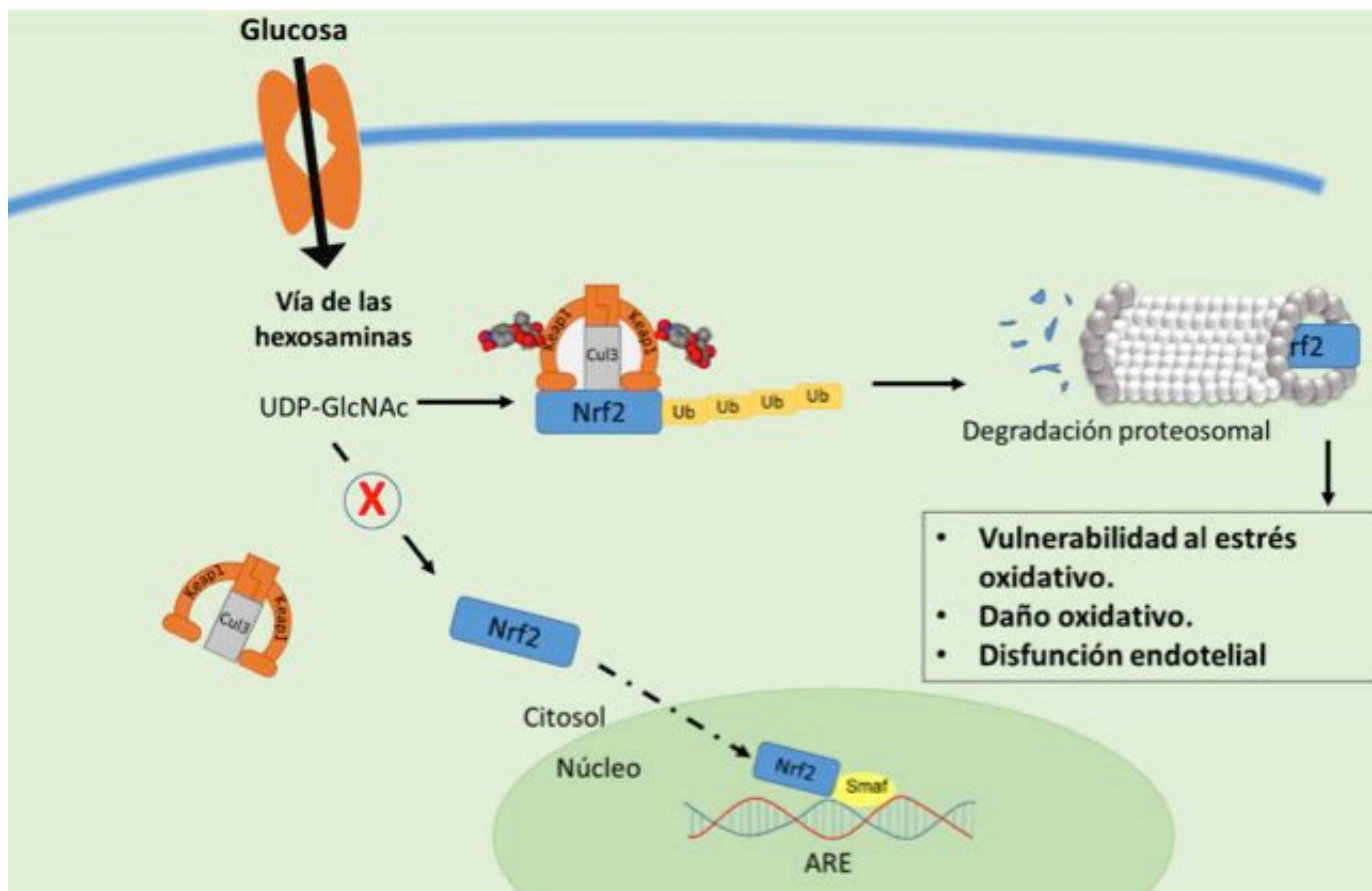


Figura 4. Mecanismo propuesto de Nrf2 en la O-GlcNAcación. En condiciones de hiperglicemia o con el uso de N-acetilglucosamina, el factor de transcripción es O-GlcNAcificado, induciendo su degradación y evitando que su represor Keap 1, se transloque al núcleo, se una a la secuencia de elementos de respuesta antioxidante (ARE) y se transcriban genes citoprotectores. Ocasionando una mayor vulnerabilidad de las células endoteliales al daño oxidante induciendo disfunción endotelial.

de NF- κ B y la reducción de la activación de Akt que conllevan a la muerte por apoptosis (35). Estos datos sugieren que a tiempos cortos, la concentración alta de glucosa tiene efectos positivos y a tiempos prolongados, efectos negativos (35). Lo anterior concuerda con la hipótesis que la O-GlcNAcación de manera crónica tiene efectos colaterales en la salud como en el caso de personas diabéticas, ya que el incremento de glucosa, incrementa el flujo en la VBH induciendo proteínas O-GlcNAcadas (10, 36).

Recientemente, se ha descrito que la O-GlcNAcación contribuyen a la disfunción endotelial mediante la activación de Nox la cual induce la producción del radical $O_2^{\cdot-}$ ocasionando fallo en la función vascular (18). Por lo tanto la evaluación de estatus antioxidante está involucrado con la disfunción endotelial.

Se conoce poco de la relación de la O-GlcNAcación y Nrf2. Chen y colaboradores describieron que Keap1 es un sustrato directo de OGT y que la


O-GlcNAcación de keap1 en la serina 104 es necesaria para la ubiquitinación y degradación de Nrf2 en células de cáncer de mama MDA-MB-231 (36).

PERSPECTIVAS

La O-GlcNAcación forma parte de la etiología de la diabetes mellitus, su elevación contribuye al desarrollo de complicaciones de la enfermedad, como la cardiomiopatía, nefropatía y retinopatía diabética (37).

En células endoteliales, la O-GlcNAcación incrementa la producción de ERO mediante la activación de Nox, NOS y la disfunción mitocondrial. A tiempos cortos, los efectos que presenta son positivos, mientras que a tiempos prolongados los efectos llegan a ser catastróficos. Aparentemente todo depende del tiempo de exposición. Otro de los mecanismos involucrados es su capacidad de regular la actividad de factores de transcripción claves en el balance redox, como el factor Nrf2.

La activación de Nrf2 permite a las células mantener el balance redox y remover las proteínas dañadas bajo condiciones de estrés oxidativo (38). Por lo tanto, su inactivación implicaría una baja respuesta antioxidante ante la producción de ERO y RL que consecuentemente, inducirían daño oxidante a biomoléculas. Algunos estudios demuestran que la O-GlcNAc modula la activación de Nrf2 en células de cardiomiocitos H9c2, de neuroblastoma SH-SY5Y y MDA-MB-23 (39–41). En células cancerígenas, la activación de Nrf2 está incrementada ocasionando un mayor crecimiento celular, resistencia a las ERO y tratamientos quimioterapéuticos (42). Sin embargo, la activación de Nrf2 en el endotelio por O-GlcNAcilación, es un tema que no se ha estudiado. Es posible que Keap1 también sea blanco de la

O-GlcNAcilación e inhiba la activación de Nrf2. Esto ocasionaría que las células endoteliales sean más vulnerables al estrés oxidante, incluso en pequeñas cantidades de ERO lo que ocasionaría la disfunción de estas células y subsecuentemente al desarrollo de aterosclerosis (43, 44). En la figura 4 hipotetizamos que la inactivación de Nrf2 en personas con diabetes explica, en parte, los efectos perjudiciales del estrés oxidativo en el endotelio, como la aterosclerosis acelerada y la trombosis (44–46). Ante este panorama el desarrollo de nuevos fármacos y el conocimiento de los mecanismos de regulación de la activación de Nrf2 podrían retrasar o incluso prevenir la aparición de las complicaciones vasculares en donde la O-GlcNAcilación se encuentre aumentada como en la diabetes mellitus. 

REFERENCIAS

- Lima VV, Spitler K, Choi H, Webb RC, Tostes RC (2012). O-GlcNAcylation and oxidation of proteins: is signalling in the cardiovascular system becoming sweeter? *Clinical Science*, 123(8), 473–486.
- Yang X, Qian K (2017). Protein O-GlcNAcylation: Emerging mechanisms and functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 18(7), 452–465.
- Song H-L, Zhang X, Wang WZ, Liu RH, Zhao K, Liu MY, Gong WM, Ning B (2018). Neuroprotective mechanisms of rutin for spinal cord injury through anti-oxidation and anti-inflammation and inhibition of p38 mitogen activated protein kinase pathway. *Neural regeneration research*, 13(1), 128–134.
- Slawson C, Housley MP, Hart GW (2006). O-GlcNAc cycling: How a single sugar post-translational modification is changing the way we think about signaling networks. *Journal of Cellular Biochemistry*, 97(1), 71–83.
- Chen PH, Chi JT, Boyce M (2018). Functional crosstalk among oxidative stress and O-GlcNAc signaling pathways. *Glycobiology*, 28(8), 556–564.
- Martinez MR, Dias TB, Natov PS, Zachara NE (2017). Stress-induced O-GlcNAcylation: an adaptive process of injured cells. *Biochemical Society Transactions*, 45(1), 237–249.
- Nam-On K, Toivola DM, Strnad P, Omary B M (2010). Cytoskeletal keratin glycosylation protects from epithelial tissue injury. *Nature Chemical Biology*, 12(9), 876–885.
- Yuzwa SA, Shan X, MacAuley MS, Clark T, Skorobogatko Y, Vosseller K, & Vocadlo DJ (2012). Increasing O-GlcNAc slows neurodegeneration and stabilizes tau against aggregation. *Nature Chemical Biology*, 8(4), 393–399.
- Wright JN, Collins HE, Wende AR, Chatham JC (2017). O-GlcNAcylation and cardiovascular disease. *Biochemical Society Transactions*, 45(2), 545–553.
- Yang S, Zou LY, Bounelis P, Chaudry I, Chatham JC, Marchase RB (2006). Glucosamine administration during resuscitation improves organ function after trauma hemorrhage. *Shock*, 25(6), 600–607.
- Nagaoka I, Igarashi M, Hua J, Ju Y, Yomogida S, Sakamoto K (2011). Recent aspects of the anti-inflammatory actions of glucosamine. *Carbohydrate Polymers*, 84(2), 825–830.
- Zhao L, Shah JA, Cai Y, Jin J (2018). 'O-GlcNAc Code' mediated biological functions of downstream proteins. *Molecules*, 23(8), 1–15.
- Tarbet HJ, Toleman CA, Boyce M (2018). A Sweet Embrace: Control of Protein-Protein Interactions by O-Linked β -N-Acetylglucosamine. *Biochemistry*, 57(1), 13–21.
- Rajapakse AG, Ming X-F, Carvas JM, Yang Z (2009). O-linked β -N-acetylglucosamine during hyperglycemia exerts both anti-inflammatory and pro-oxidative properties in the endothelial system. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2(3), 172–175.

15. Kaur R, Kaur M, Singh J (2018). Endothelial dysfunction and platelet hyperactivity in type 2 diabetes mellitus: molecular insights and therapeutic strategies. *Cardiovascular Diabetology*, 17(1), 121.
16. Liao JK (2013). Linking endothelial dysfunction with endothelial cell activation. *Journal of Clinical Investigation*, 123(2), 540–541.
17. Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ (2007). Endothelial Function and Dysfunction. *Circulation*, 115(10), 1285–1295.
18. Souza-Silva L, Alves-Lopes R, Silva Miguez J, Dela Justina V, Bianca Neves K, Leslie Mestriner F, Tostes RC, Giachini FR, Vitorino Lima V (2018). Glycosylation with O-linked β -N-acetylglucosamine induces vascular dysfunction via production of superoxide anion/reactive oxygen species. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 96(3), 232–240.
19. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(1), 44–84.
20. Ďuračková Z, Gvozdjaková A (2008). Oxidants, antioxidants and oxidative stress. En Gvozdjaková A. (eds) *Mitochondrial Medicine*. Springer, Dordrecht (pp. 19–54).
21. Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy reviews*, 4(8), 118–26.
22. Sies H, Berndt C, Jones DP (2017). Oxidative Stress. *Annual Review of Biochemistry*, 86, 715–748.
23. Vomund S, Schäfer A, Parnham MJ, Brüne B, Von Knethen A (2017). Nrf2, the master regulator of anti-oxidative responses. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(12), 1–19.
24. Ma Q (2013). Supplemental Material Role of Nrf2 in Oxidative Stress and Toxicity. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 53(1), 401–426.
25. Vomund S, Schäfer A, Parnham MJ, Brüne B, Von Knethen A (2017). Nrf2, the master regulator of anti-oxidative responses. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(12), 1–19.
26. Singh S, Vrishni S, Singh BK, Rahman I, Kakkar P (2010). Nrf2-ARE stress response mechanism: A control point in oxidative stress-mediated dysfunctions and chronic inflammatory diseases. *Free Radical Research*, 44(11), 1267–1288.
27. Yaribeygi H, Atkin SL, Sahebkar A (2019). A review of the molecular mechanisms of hyperglycemia-induced free radical generation leading to oxidative stress. *Journal of Cellular Physiology*, 234(2), 1300–1312.
28. Du XL, Edelstein D, Dimmeler S, Ju Q, Sui C, Brownlee M (2001). Hyperglycemia inhibits endothelial nitric oxide synthase activity by posttranslational modification at the Akt site. *Journal of Clinical Investigation*, 108(9), 1341–1348.
29. Ju Y, Hua J, Sakamoto K, Ogawa H, Nagaoka I (2008). Modulation of TNF- α -induced endothelial cell activation by glucosamine, a naturally occurring amino monosaccharide. *International Journal of Molecular Medicine*, 22(6), 809–815.
30. Wu Z, Xiong Y, Gajanayake T, Ming X-F, Yang Z (2012). p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Is Required for Glucosamine-Induced Endothelial Nitric Oxide Synthase Uncoupling and Plasminogen-Activator Inhibitor Expression. *Circulation Journal*, 76(8), 2015–2022.
31. Liu GD, Xu C, Feng L, Wang F (2015). The augmentation of O-GlcNAcylation reduces glyoxal-induced cell injury by attenuating oxidative stress in human retinal microvascular endothelial cells. *International Journal of Molecular Medicine*, 36(4), 1019–1027.
32. Cai X, Bao L, Ding Y, Dai X, Zhang Z, Li Y (2017). Quercetin alleviates cell apoptosis and inflammation via the ER stress pathway in vascular endothelial cells cultured in high concentrations of glucosamine. *Molecular Medicine Reports*, 15(2), 825–832.
33. Chao CL, Hou YC, Lee Chao PD, Weng CS, Ho FM (2009). The antioxidant effects of quercetin metabolites on the prevention of high glucose-induced apoptosis of human umbilical vein endothelial cells. *British Journal of Nutrition*, 101(8), 1165–1170.
34. Quagliario L, Piconi L, Assaloni R, Martinelli L, Motz E, Ceriello A (2003). Intermittent High Glucose Enhances Apoptosis related to Oxidative Stress in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. The role of protein kinase C and NAD(P)H-Oxidase Activation. *Diabetes*, 52(12), 2795–2804.
35. Ho FM, Lin WW, Chen BC, Chao CM, Yang C R, Lin LY, Lai CC, Liu SH, Liau CS (2006). High glucose-induced apoptosis in human vascular endothelial cells is mediated through NF- κ B and c-Jun NH2-terminal kinase pathway and prevented by PI3K/Akt/eNOS pathway. *Cellular Signalling*, 18(3), 391–399.

- 82 Fernández-Rojas B, Hernández-Juárez J, Gallego-Velasco IB, García-Cruz LM, Hernández-Cruz PA
36. Chen P, Smith TJ, Wu J, Siesser PF, Bisnett BJ, Khan F, Hogue M, Soderblom E, Tang F, Marks JR, Major MB, Swarts BM, Boyce M, Chi J (2017). Glycosylation of KEAP1 links nutrient sensing to redox stress signaling. *The EMBO Journal*, 36(15), 2233–2250.
 37. Banerjee PS, Lagerlöf O, Hart GW (2016). Roles of O-GlcNAc in chronic diseases of aging. *Molecular Aspects of Medicine*, 51, 1–15.
 38. Kerr F, Sofola-Adesakin O, Ivanov DK, Gatliff J, Gomez Perez-Nievas B, Bertrand HC, Martinez P, Callard R, Snoeren I, Cochemé HM, Adcott J, Khericha M, Castillo-Quan JI, Wells G, Noble W, Thornton J, Partridge L (2017). Direct Keap1-Nrf2 disruption as a potential therapeutic target for Alzheimer’s disease. *PLoS genetics*, 13(3), e1006593.
 39. Dieter B, Johnson E, Medford H, Miller L, Vella C, Marsh S (2015). O-GlcNAc plays a role in Nrf2 regulation in the myocardium. *The FASEB Journal*, 29 (1 Supplement). Abstract 974.3.
 40. Tan EP, Duncan FE, Slawson C (2017). The sweet side of the cell cycle. *Biochemical Society Transactions*, 45(2), 313–322.
 41. Sun Z, Zhang S, Chan JY, Zhang DD (2007). Keap1 Controls Postinduction Repression of the Nrf2-Mediated Antioxidant Response by Escorting Nuclear Export of Nrf2. *Molecular and Cellular Biology*, 27(18), 6334–6349.
 42. Chen PH, Chi JT, Boyce M (2017). KEAP1 has a sweet spot: A new connection between intracellular glycosylation and redox stress signaling in cancer cells. *Molecular and Cellular Oncology*, 4(6), 1–2.
 43. Davignon J, Ganz P (2004). Role of Endothelial Dysfunction in Atherosclerosis. *Circulation*, 109(23 suppl III), III-27-III-32.
 44. Gimbrone MA, García-Cardeña G (2016). Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circulation Research*. 118(4), 620-636.
 45. Katakami N (2018). Mechanism of Development of Atherosclerosis and Cardiovascular Disease in Diabetes Mellitus. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, 25(1), 27–39.
 46. Goldberg IJ, Dansky HM (2006). Diabetic Vascular Disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 26(8), 1693–1701.
 47. Lonardi E, Moonens K, Buts L, de Boer A, Olsson J, Weiss M, Fabre E, Guérardel Y, Deelder AM, Oscarson S, Wuhrer M, Bouckaert J (2013). Structural Sampling of Glycan Interaction Profiles Reveals Mucosal Receptors for Fimbrial Adhesins of Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Biology (Basel)*, 2(3), 894-917.