UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade De Medicina De Ribeirão Preto

Programa De Pós-Graduação Em Imunologia Básica E Aplicada

NATHÁLIA INÊS QUADROS E SILVA

Envolvimento da O-GlcNacilação no desenvolvimento da dor neuropática

RIBEIRÃO PRETO

Maio/2019

NATHÁLIA INÊS QUADROS E SILVA

Envolvimento da O-GlcNacilação no desenvolvimento da dor neuropática

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade São Paulo para Obtenção do título de Mestrado em Ciências.

Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada

Orientador: Prof. Dr. Thiago Mattar Cunha

RIBEIRÃO PRETO-SP

BRASIL

2019

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

Nathália Inês Quadros e Silva

FICHA CARTALOGRÁFICA

Quadros, Nathália.

Papel da O-GlcNacilação no desenvolvimento da dor neuropática.

Nathália Inês Quadros e Silva ; Orientador Prof. Dr. Thiago Mattar Cunha. Ribeirão Preto - São Paulo, 2017.138 f.: il. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Ciências. Área de concentração Imunologia Básica e Aplicada - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/Universidade de São Paulo. 2017

Orientador: Dr. Thiago Mattar Cunha

Palavras chaves: 1. Dor neuropática. 2. OGT. 3. O-GlcNacilação. 4. Via das Hexosaminas. 5. Astrócitos.

APOIO E SUPORTE FINANCEIRO

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Inflamação e dor, localizado no Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e no Laboratório do Prof. Dr. Tim Sparwasser na Hannover Medical School em Hanover, Alemanha com o apoio financeiro das seguintes agências de fomento e instituições:

1. Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP): Temático (2011/19670-0), CEPID (2013/08216-2), Centro de Pesquisa em Doenças Inflamatórias – CRID (2013/08216-2);
2. Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
3. Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FAEPA);
4. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

**"APRENDER É A ÚNICA COISA QUE A MENTE NUNCA SE CANSA, NUNCA
TEM MEDO E NUNCA SE ARREPENDE"**

LEONARDO DA VINCI

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho à minha família, principalmente meus pais, Eduardo e Cidinha, que não pouparam esforços para me dar uma boa formação. Sempre me apoiaram nos momentos difíceis e acreditaram em mim, mesmo quando nem eu mesma acreditava.

ESSE MEDO DE
NÃO SER NADA
É TUDO O QUE
EU TENHO PARA
ME ENCORAJAR
A TENTAR SER
ALGO.

EU
ME
CHAMO
ANTONIO

Nome: Quadros, Nathália

Título: Envolvimento Da O-Glcnaçilação No Desenvolvimento Da Dor Neuropática

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências – Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Aprovado (a) em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Trabalho realizado no Laboratório de Inflamação e Dor, Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. O trabalho recebeu auxílio financeiro do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Doenças Inflamatórias, FAPESP, CAPES e CNPq.

AGRADECIMENTOS

Costumo dizer que aprendi mais em 2 anos de mestrado do que em toda minha vida, tanto no sentido intelectual como no sentido pessoal. Nestes dois anos pude testar meus limites, e acreditar em mim mesma. Pude conhecer e conviver com pessoas que me ensinaram sobre muitas coisas, inclusive sobre a ciência e sobre a vida. Independente se foram exemplos negativos ou positivos, o que ficou foi a evolução que eu tive como pessoa, me sinto orgulhosa da pessoa que me tornei tanto no âmbito profissional como no pessoal. Assim como Antoine de Saint-Exupéry acredito que “aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós, deixam um pouco de si, levam um pouco de nós”, e o que sou hoje devo a cada um que passou pela minha vida, e em especial as pessoas que irei agradecer aqui, que tornaram meus dias mais leves e agradáveis.

Gostaria de agradecer a meu orientador o Prof. Dr. Thiago Mattar Cunha por abrir as portas de seu laboratório, por sua supervisão, pelas oportunidades e por me permitir crescer no seu laboratório e contribuir em minha formação profissional durante esse tempo. Ao Prof. Dr. Fernando Cunha e José Carlos Alves pelas discussões científicas e pelo apoio e infra-estrutura para a realização deste trabalho

Aos meus colaboradores de trabalho e também amigos: Rangel, Alexandre Lopes, Isaac. Obrigada pela paciência, disposição e ensinamentos, e desculpe pelos meus choros e desesperos. O laboratório ficava mais agradável na presença de vocês. A todos os demais alunos do grupo da “Dor”: Andreza Urba, Mateus (saudades), Maria Cláudia, Elidiane, Alexandre Maganin, Joana, Claudinha, Fábio Bezerra, Nerry, Miriam, Rafaela, Atlante e agregados, obrigada pelas discussões científicas.

Aos demais amigos do LID, em especial: Ana Letícia, Douglas, Katiussia, Talitinha, Gabs, Marcos, Cesar, Vanessa, Maranhão. Obrigada por terem me ajudado sempre que

necessário e por terem tornado minha jornada dentro do laboratório mais leve, proveitosa e divertida.

Aos meus amigos do coração que fiz por meio da FMRP: Tamara, Jefferson Leite, Bell, Ricardo Castro, Ricardo Souza, Gabriel Nogueira, Fany, Camila Oliveira, Murilo, Lia agradeço pela força, pelas boas conversas, pelos churrascos, pelos roles e pela amizade que vou levar no meu coração para sempre. Aos amigos de Ribeirão em especial: Naara, Bruce e Tila.

Agradeço aos meus amigos que fiz ao longo da minha vida, que mesmo na distância nunca deixaram nossa amizade morrer, em especial Terensie, Vagner, Nat, Bianca, Naji, Beatriz, Rafaela, Clara, Karla, Carine, Camila Moraes, Su e Camargos.

Á minha família, principalmente meus pais Cidinha e Eduardo, meu irmão Thales, madrinha Marlísia, tia Marilene, tio Washington, tio Nelsinho, tia Fátima, tia Mara e tia Cláudia, obrigada pelo apoio e por acreditar em mim. Ao meu melhor amigo e companheiro Danilo, que aguentou minhas crises, meus nervosos e sempre esteve ao meu lado me dando amor e suporte. Muito obrigada vocês foram essenciais.

Á amiga e secretária Ana Cristine S. Ferreira pelo auxílio e atenção ao nosso programa de pós-graduação, e em especial comigo. Aos técnicos do Departamento de Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, em especial a Ieda, que se tornou uma amiga muito importante.

Aos professores do programa de Imunologia básica e Aplicada, de Bioquímica e de Farmacologia, onde eu realizei minha formação acadêmica no mestrado.

A Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) pela infraestrutura utilizada. À CAPES, FAPESP, FAEPA, CRID pelo auxílio financeiro que possibilitou a realização deste trabalho.

Aos professores membros da banca avaliadora da tese pela disponibilidade e sugestões.

Os meus mais sinceros agradecimentos!

RESUMO

QUADROS, N. O envolvimento da O-GlcNacilação no desenvolvimento da dor neuropática. 2019. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

RESUMO

A dor neuropática é um tipo de dor crônica causada por lesão ou doença no sistema nervoso somatossensorial. A fisiopatologia da dor neuropática é complexa, portanto, faz-se necessária uma compreensão dos mecanismos subjacentes para que seja possível identificar novos alvos para intervenção terapêutica. Conforme sugerido por estudos recentes, modificações pós-traducionais em proteínas-alvo do sistema somatossensorial podem contribuir para a fisiopatologia de diversas doenças. A O-GlcNacilação induzida pela N-AcetilGlucosamina Transferase (OGT), um tipo de modificação pós-traducional, promove a ligação reversível de N-acetilglucosamina, produto final da via das hexosaminas, em resíduos de serina e treonina de proteínas. Apesar de a O-GlcNacilação ter uma importância biológica na modulação da função proteica em diversos contextos fisiopatológicos, seu papel na fisiopatologia da dor neuropática permanece desconhecido. Assim sendo, o objetivo deste trabalho foi investigar o envolvimento da O-GlcNacilação no desenvolvimento da dor neuropática. A avaliação da expressão gênica e proteica de enzimas pertencentes à via das hexosaminas e da atividade de OGT na medula espinal de camundongos C57/BL6, submetidos ao modelo de dor neuropática por injúria de nervos periféricos com nervo poupado (do inglês spared nerve injury - SNI), revelou um aumento significativo. Foi observado também que a expressão de OGT na medula espinhal estava confinada quase que exclusivamente em astrócitos. Por fim, foi verificado que a ausência de OGT em astrócitos reduz o desenvolvimento da dor neuropática no modelo de SNI. Este estudo demonstra pela primeira vez um papel funcional da O-GlcNacilação para o desenvolvimento da dor neuropática, apontando para um possível alvo para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas.

Palavras Chave: Dor Neuropática, O-GlcNacilação, OGT, N-acetilGlucosamina

ABSTRACT

QUADROS, N. The involvement of O-GlcNacilation in the development of neuropathic pain. 2019. Master's dissertation. Ribeirao Preto Medical School, University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, SP, 2018.

ABSTRACT

Neuropathic pain is a type of chronic pain caused by injury or disease in the somatosensory nervous system. The pathophysiology of neuropathic pain is complex, therefore, it is necessary to understand the underlying mechanisms to be possible identify new targets for therapeutic intervention. As suggested by recent studies, post-translational modifications in target proteins of the somatosensory system may contribute to the pathophysiology of various diseases. O-GlcNacylation induced by N-Acetyl Glucosamine Transferase (OGT), a type of post-translational modification, promotes the reversible attachment of N-acetylglucosamine, the end product of the hexosamine pathway, to serine and threonine protein residues. Although O-GlcNacylation has biological importance in the modulation of protein function in various pathophysiological contexts, its role in the pathophysiology of neuropathic pain remains unknown. Therefore, the objective of this work was to investigate the involvement of O-GlcNacilation in the development of neuropathic pain. The evaluation of the gene and protein expression of enzymes belonging to the hexosamine pathway and the OGT activity in the spinal cord of C57 /BL6 mice submitted to the neuropathy model of spared nerve injury (SNI), showed a significant increase. It was also observed that OGT expression in the spinal cord was confined almost exclusively in astrocytes. Finally, it was found that the absence of OGT in astrocytes reduces the development of neuropathic pain in the SNI model. This study demonstrates for the first time a functional role of O-GlcNacilation for the development of neuropathic pain, pointing to a possible target for the development of new therapeutic approaches.

Keywords: Neuropathic pain, O-GlcNacylation, OGT, N-acetylGlucosamina

Sumário

1. INTRODUÇÃO	21
1.1. Dor	22
1.2. Dor Neuropática.....	23
1.3. Resposta Neuroimune No Desenvolvimento E Manutenção Da Dor Neuropática	25
1.4 Astrócitos	27
1.5. Via Metabólica das Hexosaminas e O-GlcNacilação	29
1.5.1. Conceitos gerais	29
1.5.2 O-GlcNacilação No Sistema Nervoso Central.	32
2. OBJETIVOS	35
2.1. Objetivo geral	36
2.2 Objetivos específicos e delineamento experimental	36
3. MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1. Animais	38
3.2. Drogas	39
3.3 Modelo Experimental De Dor Neuropática Sni (<i>Spared Nerve Injury</i>)	39
3.4. Nocicepção Mecânica	39
3.4.1 Avaliação Nociceptiva Mecânica- Teste De Von Frey Filamento.....	39
3.4.2 Frequência De Retirada Da Pata	40
3.4.3 Avaliação Alodinia Ao Frio (Teste Da Acetona).....	40
3.5 Coleta De Amostras	41
3.6 Western Blotting	41
3.7 Reação Em Cadeia Da Polimerase-Transcriptase Reversa Em Tempo Real:.....	42
3.8. Imunofluorescência.....	44
3.9 Sorting Celular	45
3.10 Tratamento Com Tamoxifeno.....	46
3.11 Coleta E Preparo Das Amostras Para Genotipagem	47
3.11.1 PCR	47
4. RESULTADOS	49
4.1 Padronização Do Modelo De Sni.....	50
4.2 Avaliação Da Expressão Gênica Diferencial De Enzimas Metabólicas Durante A Neuropatia Induzida Por Sni	52
4.3 Avaliação Da Expressão Gênica Diferencial De Enzimas Da Via Das Hexosaminas Durante A Neuropatia Induzida Por SNI	55
4.5avaliar Células Do Sistema Nervoso Central Que Expressam Ogt	59
4.6 Ogt Presente Em Astrócitos Possui Papel Na Neuropatia.	63

5.DISSCUSSÃO	67
6.CONCLUSÃO.....	74
7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76

1.INTRODUÇÃO

1.1. Dor

A dor é definida pela Associação Internacional do Estudo da Dor (do inglês *International Association for the study of pain* - IASP) como uma “experiência emocional e sensorial desagradável associada a uma lesão tecidual real ou potencial”. A experiência dolorosa é interpretada por cada indivíduo de acordo com experiências prévias de dor, o que justifica sua quantificação ser subjetiva e complexa. Por isso, em animais de laboratório, utiliza-se o termo “nocicepção” (“noci” significa “nocivo”; “cepção” significa “recepção”) para definir respostas comportais e neurofisiológicas da dor em modelos experimentais, dissociando do caráter cognitivo-afetivo da resposta que se observa em pacientes com dor (Cohen and Mao 2014).

As vias de transmissão da dor formam um sistema complexo de grande importância para a defesa do organismo pois proporciona alerta precoce ao sistema nervoso desencadeando uma possível resposta motora, minimizando possíveis lesões nos tecidos. Uma vez que os estímulos nocivos são reconhecidos pelas extremidades de neurônios sensoriais livres na pele (os nociceptores), a informação dolorosa é transmitida pelas fibras A δ (mielinizadas e de condução rápida), e pelas fibras C (não-mielinizadas e de condução lenta), cujos corpos celulares estão localizados nos gânglios da raiz dorsal (GRD), situados paralelamente à coluna vertebral e fora do sistema nervoso central (Basbaum et al. 2009; De Moulin et al. 2014). Assim, frente a um estímulo, o sinal nocivo externo será transduzido em atividade elétrica, desse modo os potenciais de ação serão conduzidos pelas fibras sensoriais que adentram o sistema nervoso central, até o corno dorsal da medula espinhal, onde ao se encontrar com o neurônio de segunda ordem irão realizar sinapse (Scholz and Woolf 2002; Tong and Macdermott 2014; Chen et al. 2019). Esse segundo neurônio transmite a informação por diferentes tratos nervosos, incluindo os tratos espinotalâmico e espinoreticulotalâmico, até o tálamo (Hunt and Mantyh 2001),

onde a informação converge para o córtex somatossensorial, fornecendo informações sobre localização e a intensidade do estímulo doloroso, e até o córtex insular e cingular, onde há o reconhecimento do componente afetivo emocional da dor (Basbaum et al. 2009).

Temporalmente, a dor pode persistir por meses progredindo para uma síndrome denominada dor crônica. A dor crônica tem se tornado um problema de saúde pública crescente: afeta a qualidade de vida das pessoas, uma vez que é debilitante e intensa, e muitas vezes é resistente aos medicamentos disponíveis no mercado (Ohayon and Stingl 2012; Johannes et al. 2010). Estima-se que cerca de 30% da população mundial adulta é afetada por essa condição, sendo que a prevalência deste quadro no Brasil varia entre 28 a 41% (Van Hecke et al. 2014). Sendo assim, observa-se que existe uma necessidade de compreender os mecanismos relacionados à dor crônica para o desenvolvimento de novos tratamentos. A dor crônica abrange diferentes tipos de dor, incluindo dor inflamatória, dor do câncer e dor neuropática, sendo esta última o foco deste trabalho.

1.2. Dor Neuropática

A dor neuropática é definida pela IASP como dor crônica causada por lesão ou doença no sistema nervoso somatossensorial, podendo levar a profundas alterações cognitivas e emocionais no cérebro. Essa patologia afeta cerca de 10% da população mundial (Van Hecke et al. 2014). No Brasil, um estudo incluindo 1597 pessoas mostrou que 10% dos pacientes com dor crônica apresentam características neuropáticas (Van Hecke et al. 2014), sendo este número superior se comparado a outros países, como da França (Bouhassira 2008) e o Reino Unido (Torrance et al. 2006). As condições que levam a dor neuropática são diversas, incluindo lesões traumáticas, infecções virais, síndrome

do túnel do carpo, uso de quimioterápicos, Acidente Vascular Cerebral (AVC), doenças metabólicas, entre outras (Scholz and Woolf 2002).

Os principais sintomas relacionados à dor neuropática são a hiperalgesia (sensação dolorosa aumentada a um estímulo que normalmente causa dor), alodinia (sensação dolorosa a um estímulo que normalmente não provoca dor), parestesia (sensibilização geral, que se traduz em uma sensação de dormência ou formigamento), disestesia (perda de sentido, em especial o tato) e dor espontânea, além de modificações comportamentais (como depressão e insônia) (Scholz and Woolf 2002; Merskey and Bogduk 1994; Trang, Beggs, and Salter 2006). Estes sintomas podem oscilar em intensidade e tempo de duração. Dessa forma, a lesão no tecido irá resultar em amplificação da resposta nociceptiva frente a estímulos nocivos e inócuos, que passam a ser percebidos como dolorosos. Essa amplificação é causada pela alteração da expressão de receptores, canais iônicos e neurotransmissores, aumento na excitabilidade dos terminais de nociceptivos, acoplamento neuronal sensorial simpático, morte celular neuronal, facilitação e desinibição sináptica, mudanças na conectividade sináptica, reorganização do circuito nociceptivo central (Clark, Old, and Malcangio 2013; Austin and Moalem-Taylor 2010; Tsuda, Inoue, and Salter 2005; Watkins, Milligan, and Maier 2001; Scholz and Woolf 2002, 2007).

As intervenções terapêuticas utilizadas no tratamento contra a dor neuropática têm se mostrado ineficientes. Embora alguns indivíduos possam inicialmente responder a esses tratamentos, a terapia medicamentosa se torna falha ou perde a sua eficácia, além de causar diversos efeitos colaterais ao longo do tempo (A. M. et al. 2006; Colloca et al. 2017; Mika et al. 2013; De Moulin et al. 2014). Devido à complexidade dessa síndrome, é essencial a compreensão aprofundada dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos no desenvolvimento da dor neuropática para a elaboração de novos fármacos.

1.3. Resposta Neuroimune No Desenvolvimento E Manutenção Da Dor Neuropática

Os mecanismos envolvidos na dor neuropática não são exclusivamente neuronais: células de Schwann, células satélites, células da glia (astrócitos, micróglia e oligodendrócitos) e células do sistema imune residentes ou recrutadas também podem modular a resposta nociceptiva exacerbada (Marchand 2005; Sorge 2017). Após lesão do nervo periférico, células imunes residentes (macrófagos, monócitos) e células de Schwann são as primeiras a reagirem ao dano produzindo mediadores pró-inflamatórios, como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-1 beta (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6), quimiocinas (CCL-2), óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio, que juntos contribuem para o recrutamento de leucócitos. Além disso, ocorre um infiltrado massivo de macrófagos e neutrófilos para o local da lesão, e em menores proporções os linfócitos também são recrutados, estes também irão secretar mediadores pró-inflamatórios. Toda esta complexa resposta inflamatória gerada no local da lesão, culmina na produção de diferentes mediadores hiperalgésicos tais como citocinas, quimiocinas, eicosanoides, substância P, e radicais livres que podem atuar na superfície dos neurônios nociceptivos primários via receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) ou agirem diretamente em canais iônicos provocando sua abertura (Basbaum et al. 2009; Bevan and Wilson 1999). Uma vez ativados, esses receptores ou canais podem regular direta ou indiretamente a permeabilidade da membrana neuronal, alterando o fluxo iônico dos neurônios, facilitando a geração e transmissão de impulsos nervosos (Cunha, et al. 1999; Garwood et al. 2017; Devor et al. 1993; Waxman 1999). Nota-se, portanto, que os eventos da periferia são cruciais para o estabelecimento da neuropatia.

Em relação ao sistema nervoso central, mais especificamente a medula espinhal, as células da glia são as células imunes do sistema nervoso central, que em conjunto com

células neuronais são responsáveis por modular a dor. Muitas evidências anteriores demonstram que a ativação da microglia na medula espinhal participa do desenvolvimento da dor neuropática por meio da produção de citocinas pró-inflamatórias e do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), (Suter, Wen, Decosterd 2002; Kazuhide and Makoto 2009; Coull et al. 2005; Francisco et al. 2009; T. M 2003), permitindo a associação da micróglia com a dor neuropática.

Os astrócitos sofrem alterações morfofuncionais após lesão neuronal: perdem a capacidade de manter as concentrações homeostáticas de potássio extracelular e glutamato, contribuindo para a excitabilidade neural. A alteração na comunicação dessas células leva a um aumento da liberação de glutamato, ATP e quimiocinas, que podem atuar como neuromoduladores e potencializar a transmissão sináptica direta ou indiretamente, uma vez que as junções comunicantes entre astrócitos e neurônios encontram-se com a expressão aumentada em modelos experimentais de indução de dor neuropática. A resposta astrocitária demonstra ser mais tardia se comparado com a resposta microglial, no entanto é sustentada por um longo período, sugerindo que essas células possam ser importantes na manutenção da dor crônica. Em 2010 um estudo demonstrou que a ativação de astrócitos é suficiente para induzir a dor crônica, uma vez que astrócitos ativados com TNF α foram injetados via intratecal na medula espinhal de camundongos, e foram capazes de induzir alodinia mecânica. Curiosamente, após lesão no sistema nervoso periférico os astrócitos reativos passam a expressar c-Jun-N-terminal quinase (JNK), membro da família de *mitogen-activated protein kinase* (MAPK), e produz interleucina-1 β (IL-1 β) e quimiocina MCP-1, aumentando e mantendo estados de sensibilização central e dor crônica (Y. J. Gao, Zhang, and Ji 2010; X. Gao et al. 2012; Guo W et al. 2012; Kawasaki et al. 2008; Ren 2009; Y.-J. Gao and Ji 2010).

Tendo em vista que os astrócitos, estão envolvidos em mecanismos diretos e indiretos no sistema nervoso central após lesão periférica, fica evidente a necessidade de explorar e compreender as funções e os papéis modulatórios dos astrócitos durante o desenvolvimento e manutenção da neuropatia.

1.4 Astrócitos

Os astrócitos estão envolvidos em diversos processos do sistema nervoso central, nos quais são essenciais para as funções cerebrais. Sabe-se que o cérebro requer cerca de 20% da glicose e oxigênio do sangue durante atividade cerebral, para restaurar os gradientes iônicos após a neurotransmissão (Bélanger, Allaman, and Magistretti 2011). Devido à grande demanda metabólica é necessário que o fluxo sanguíneo permaneça constante apesar das variações da pressão arterial, e que as áreas de alta atividade neuronal recebam os suprimentos energéticos devidos. Os astrócitos são reguladores multifuncionais do acoplamento neurometabólico, responsáveis por controlar os níveis de neurotransmissores nas fendas sinápticas, os níveis de íons extracelulares, além de fornecerem substrato aos neurônios, uma vez que neurônios não possuem reserva energética (Bélanger, Allaman, and Magistretti 2011).

A dependência energética do cérebro pela glicose é explicada devido a incapacidade dos ácidos graxos ligados a albumina atravessarem a barreira hematoencefálica, além da produção de ATP exigir menos oxigênio da glicose do que de ácidos graxos. Os astrócitos possuem em suas projeções transportadores de glicose chamados GLUT1 (Kacem et al. 1998), que estão relacionados à entrada de glicose no cérebro. A atividade de GLUT1 é estimulada pelo glutamato (Anitsi Loaiza, Omar H. Porras 2009; Nelson and Guyer 2012; J and Carlton 1994), mecanismo no qual une a atividade sináptica com o suprimento energético. Os astrócitos mantêm um pool substancial de glicose armazenada, assim a glicose pode deixar os astrócitos, para ser

usada em processos perisinápticos. A afinidade relativamente baixa da glicose pelo GLUT1(Wilcox and Hirshkowitz 2015; Prebil et al. 2011; Bittner 2010), promove regulação do influxo e o efluxo de glicose(Weber and Barros 2015). Assim sendo, Após entrada da glicose nos astrócitos, esta será fosforilada pela hexoquinase (HK) produzindo glicose-6-fosfato, que será convertida em frutose-6P pela enzima Glicose-6-fosfato isomerase (GPI). A frutose-6P pode ser processada através de diferentes vias, como a glicólise via metabólica mais conhecida (levando a produção de lactato e metabolismo mitocondrial) que está descrita na Figura 1. Uma via menos conhecida, mas que tem sido bastante estudada em doenças neurodegenerativas é a via das hexosaminas (Wani et al. 2017; Zhu et al. 2014).

Figura 1. Esquema das etapas metabólicas da via glicolítica e da via das hexosaminas. As proteínas marcadas em vermelho foram avaliadas neste estudo.

1.5. Via Metabólica das Hexosaminas e O-GlcNacilação

1.5.1. Conceitos gerais

A via metabólica das hexosaminas (VMH) é um ramo relativamente menor da glicólise na qual a frutose-6P é convertida pela primeira enzima específica da via, glutamina frutose-6-fosfato amidotransferase (GFAT). Cerca de 2% a 5% da frutose-6P pode ser desviada para a VMH, dependendo da atividade GFAT(Buse 2007). Existem

duas isoformas para esta enzima, a GFAT1 e a GFAT2, com 75% de homologia estrutural, a mesma atividade funcional e diferem quanto à distribuição no organismo. A GFAT catalisa a hidrólise da glutamina em glutamato e amônia, e a aminação/isomerização da frutose-6P em D-glucosamina (Hu et al. 2004). A enzima glucosamina-6-P N-acetiltransferase (GNPNAT1) promove a desacetilação de um acetil-CoA e acetilação da Dglucosamina-6P gerando N-acetil-D-glucosamina-6P (Vosseller 2006). Este aminoaçúcar acetilado será convertido em Nacetil-D-glucosamina-1P, pela enzima fosfoglicomutase 3 (PGM3), o qual será anexado em sua estrutura um nucleotídeo ativador pela ação da enzima UDP-N-acetilglicosamina pirofosforilase1 (UAP1) (Han and Kudlow 1997; Baudoin and Issad 2014; Bond and Hanover 2015; Hurtado-Guerrero, Dorfmueller, and van Aalten 2008) (Figura 2). O produto final gerado pela a via das hexosaminas é o UDP-N-acetilglucosamina, que será anexado ao grupo de hidroxila presente em serinas e treoninas de proteínas nucleares e citoplasmáticas, catalisado por uma enzima chamada O-GlicosilTransferase (OGT), enquanto a O-GlcNAcase (OGA) catalisa a remoção de O-GlcNAc das proteínas modificadas. Essa modificação pós traducional é também conhecida como O-GlcNacilação.

O primeiro relato de proteína O-GlcNacilada foi em 1984, por Torres e Hart (C.-R. T. & G. W. Hart 1984), um novo tipo de glicosilção, no qual possui função modulatória crucial para eucariontes superiores (Sun et al. 2016). A O-GlcNacilação ocorre no mesmo sitio de fosforilação, levando a crer que a fosforilação pode ativar e a O-GlcNacilação pode inativar proteínas (ou vice-versa). No entanto existem diversas enzimas responsáveis pela fosforilação, diferentemente da O-GlcNacilação que é dependente da ação apenas de um par de enzimas, a OGT (O-GlicosilTransferase) e a OGA (O-GlcNacase) (G. W. Hart and Marth 2000; Gerald W. Hart 2011). A OGT possui 3 isoformas diferentes, as quais compartilham o mesmo domínio catalítico e um domínio de interação

proteína-proteína, consistindo em mais de 11 repetições de tetratricopéptido (TPR), no entanto possuem diferenças no tamanho da região amino terminal e na localização subcelular. Nas células de mamíferos, o RNAm de OGT é processado levando a transcritos alternativos, dos quais dois são bem caracterizados OGT mitocondrial (mOGT) e OGT nucleocitoplasmático (ncOGT)(Paula Santoyo-Ramos 2018). Existe ainda um outro subtipo de OGT denominado EOGT, a qual é encontrada no retículo endoplasmático, e também é responsável por realizar O-GlcNacilação(Van Den Steen et al. 2014).

Já foram identificadas mais de 1000 proteínas O- GlcNaciladas por OGT (Vosseller 2006; Van Den Steen et al. 2014), dentre as diversas classes de proteínas modificadas estão, fatores de transcrição, nucleoporinas, proteínas mitocondriais, enzimas, quinases e proteínas estruturais (Hart, G. 2011). É necessário que um processo que promove a modificação pós traducional de tantas proteínas seja regulado, para isso existem diversos mecanismos: como o splicing de suas variantes, pela expressão gênica tecido/organela dependentes; pela formação de oligômeros que permitam maior interação com os substratos; através de suas próprias modificações pós-traducionais, bem como as dos seus substratos e também pelo fluxo de nutrientes. (Baudoin and Issad 2014; Paula Santoyo-Ramos 2018; Van Den Steen et al. 2014; G. W. Hart and Marth 2000; Hurtado-Guerrero et al .2008).

Ao contrário da OGT, a OGA é responsável por catalisar a remoção da N-acetil glucosamina, é uma proteína de 917 aminoácidos, com pelo menos dois domínios funcionais: um domínio N-terminal com atividade hexosaminidase e um domínio C-terminal com atividade do tipo histona acetiltransferase (HAT). O equilíbrio dessas duas proteínas é fundamental para a manutenção da homeostase, uma vez que tem sido

demonstrado que a ausência de qualquer uma dessas enzimas causa letalidade neonatal (Yang et al. 2012; Olivier-Van Stichelen et al. 2017).

Figura 2. Síntese de UDP-N-AcetilGlucosamina à partir de glicose pela Via das Hexoxaminas. Adaptado de (Paula Santoyo-Ramos 2018).

1.5.2 O-GlcNacilação No Sistema Nervoso Central.

Os estudos relacionados a via das hexosaminas e O-GlcNAcilação foram por muitos anos negligenciados pela comunidade científica. No entanto, recentes estudos têm demonstrado que a O-GlcNAcilação tem uma estreita relação com o sistema nervoso central, uma vez que está envolvida em processos como de crescimento de neuritos

(Rexach et al. 2012), ramificação axonal (Francisco et al. 2009), plasticidade sináptica (Tallent et al. 2009), recuperação de contusões na medula espinhal, migração de astrócitos (Mao et al. 2015) e doenças neurodegenerativas (Wani et al. 2017; Zhu et al. 2014; Willayat Y Wani and Zhang 2017).

Em 1996, Hart relaciona a O-GlcNacilação com microtúbulos associados a proteína tau, na qual, quando hiperfosforilada contribui para morte neuronal, consequentemente para o Alzheimer (Arnold et al. 1996). À medida que os estudos científicos avançaram, foi demonstrado que a O-GlcNacilação é abundante no sistema nervoso central, cerca de 20% de proteínas sinaptossômicas são O-GlcNaciladas (Trinidad et al. 2012), além do que a OGT e a OGA são abundantes nas sinapses neuronais (O'Donnell et al. 2004). A O-GlcNacilação tem papel na manutenção e sobrevivência de neurônios (Su and Schwarz 2017) e está envolvida na regulação de receptores glutamatérgicos, presentes nas sinapses neuronais. Atualmente já se sabe que a fosforilação de resíduos de serina das subunidades do receptor glutamatérgico AMPA modulam o tráfico de neurotransmissores durante mudanças da transmissão excitatória do hipocampo que são necessárias para o aprendizado e memória normais. A O-GlcNacilação ocorre nos mesmos sítios de fosforilação, indicando existir uma competição entre as duas modificações pós-traducionais, sugerindo um papel potencial para a O-GlcNacilação na modificação da eficácia sináptica e da cognição (Taylor et al. 2014).

A O-GlcNacilação também foi relacionada com doenças neurodegenerativas como no desenvolvimento do Alzheimer (proteína tau) (Zhu et al. 2014; Willayat Y Wani and Zhang 2017) e na doença de Parkinson (proteína α -sinucleína) (Wani et al. 2017). Além de doenças neurodegenerativas, a O-GlcNacilação está presente em doenças metabólicas como o diabetes, no qual demonstrou-se que o aumento da O-GlcNacilação

está diretamente ligada à resistência insulina e à toxicidade da glicose induzida pela hiperglicemia (M.a. and Hart 2013; Peterson and Hart 2016)

Embora exista estudos que correlacione doenças neurodegenerativas, sistema nervoso central, receptores glutamatérgicos, ou disfunções metabólicas à O-GlcNacilação, ainda não existe um estudo que correlacione esta modificação pós-traducional com o desenvolvimento de dor neuropática. Portanto este trabalho tem como objetivo compreender se há envolvimento da dor neuropática com a modificação pós traducional O-GlcNacilação.

2.OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Investigar se a via das hexosaminas e O-GlcNacilação participa do processo de desenvolvimento da dor neuropática após lesão de nervos periféricos.

2.2 Objetivos específicos e delineamento experimental

- 1) Avaliar a expressão das diferentes enzimas envolvidas na via glicolítica e na via das hexosaminas (HK 1, HK 2, PDK-1, PFKFB3, PKM-1 OGA e GFAT1 e 2) na medula espinhal após a indução da dor neuropática.
- 2) Avaliar o perfil de O-GlcNacilação na medula espinhal após a indução de neuropatia.
- 3) Investigar quais células do sistema nervoso central expressam OGT.
- 4) Compreender o envolvimento funcional de OGT expressa por células astrocíticas durante o desenvolvimento da dor neuropática.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética e Experimentação Animal (CEUA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP sob o protocolo 0197/2017 (Anexo 1). Foram utilizados camundongos C57BL/6 do biotério central de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Camundongos B6.129 - $Ogt^{tm1Gwh/J}$ (OGT^{flox}) obtidos do laboratório JackSon, que possuem os sítios loxP flanqueando os exons que codificam os aminoácidos 206-232 do gene *Ogt* ligado ao cromossomo X, foram cruzados com camundongos 012849 - 6.Cg-Tg(GFAP-cre/ERT2)505Fmv/J (*Gfap-cre*) obtidos através do laboratório Jackson, nos quais a expressão de Cre é observada em astrócitos do cérebro, da medula espinhal, além de células-tronco neurais pós-natais. O cruzamento de camundongos OGT^{flox} e *Gfap-cre* gerou uma linhagem de camundongos deficientes de OGT em células astrocíticas. A deficiência de OGT nos astrócitos é condicionada a aplicação de doses de tamoxifeno, este induz a migração da enzima cre expressa em células GFAP positivas para o núcleo, onde ela irá clivar o sítio loxP que codificam os aminoácidos do gene de OGT. Para confirmar que os animais eram OGT^{flox} -GFAP-cre positivos realizamos genotipagem, que confirmou o genótipo dos animais. Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Farmacologia e no biotério da Clínica médica sob condições de temperatura e ciclo claro/escuro controlados, com livre acesso à ração e água. Todos os experimentos seguiram as normas de ética estabelecidas pela IASP (International Association for the Study of Pain) a fim de minimizar o sofrimento do animal durante todo o curso do procedimento experimental.

3.2. Drogas

Tamoxifeno((Z)-1-(p-Dimethylaminoethoxyphenyl)-1,2-diphenyl-1-butene, trans-2-[4-(1,2-Diphenyl-1-butenyl)phenoxy]-N,N-dimethylethylamine) código T5648, Sigma Aldrich.

3.3 Modelo Experimental De Dor Neuropática Sni (*Spared Nerve Injury*)

O procedimento cirúrgico de Spared Nerve Injury (SNI), consiste na incisão na lateral direita na pele do animal, o musculo é delicadamente afastado para que os três ramos do nervo ciático dos camundongos sejam isolados, e os ramos peroneal e tibial sejam ligados com fio de sutura e cortados, posteriormente o animal é suturado. (Bourquin et al., 2006).

3.4. Nocicepção Mecânica

Os animais não expressam de forma verbal a dor, porém apresentam sinais que exibem respostas motoras e fisiológicas observadas em humanos. A avaliação dessas repostas permite inferir que o animal experimentou uma sensação desagradável nociceptiva. Sendo assim o termo nocicepção abrange respostas comportamentais e neurofisiológicas da dor dissociando do caráter cognitivo-afetivo da dor. Portanto o comportamento foi avaliado através de testes comportamentais de Von Frey, frequência e alodinia ao frio, após a indução de neuropatia (Cunha et al., 2004).

3.4.1 Avaliação Nociceptiva Mecânica- Teste De Von Frey Filamento

Conforme descrito previamente por Cunha et al.,2004, foi realizado a avaliação de hipersensibilidade nociceptiva mecânica em camundongos. Os camundongos foram colocados em caixas de acrílico, cujo assoalho é constituído por uma rede de malha de arame não maleável, 30-45 minutos antes do experimento, para habituação ao ambiente.

O limiar mecânico foi determinado por uma série de filamentos de von Frey (Stoelting, Chicago, IL, USA) com aumento da rigidez logaritmicamente (-1,17 a 0,74 log da força, g) no qual foi aplicado na lateral da pata posterior direita, região na qual é innervada pelo sural. O estímulo é interrompido após a resposta nociceptiva de retirada da pata, caracterizada por flexão seguida de retirada da pata, “flinch”. Cada um dos filamentos de von Frey foi aplicado uma vez por aproximadamente 3 segundos. O filamento de menor força capaz de induzir resposta foi determinado como sendo o limiar mecânico de retirada da pata (g).

3.4.2 Frequência De Retirada Da Pata

Os animais foram colocados em caixas de acrílico, cujo assoalho é constituído por uma rede de malha de arame não maleável, 1 hora antes do experimento, para habituação ao ambiente. A frequência de retirada de pata foi determinada pelo uso de dois filamentos de von Frey (0.008g), avaliando o número de respostas de retirada da pata após 10 estímulos na área central da pata caracterizada por flexão seguida de retirada da pata, “flinch”. As respostas foram expressas em médias absolutas do número de respostas positivas após dez estímulos.

3.4.3 Avaliação Alodinia Ao Frio (Teste Da Acetona)

No mesmo aparato onde é realizado o teste de von Frey, e sob as mesmas condições, uma gota (100 µL) de acetona PA foi instilada na área central da superfície plantar da pata posterior com auxílio de uma seringa de 1 mL, sem agulha, abrangendo a superfície plantar, como o dorso da pata. O estímulo frio causado pela acetona provoca comportamentos de agitação e elevação da pata, além de lambidas. Esse tipo de resposta é caracterizado como comportamento nocifensivo e o tempo gasto pelo animal com esse

comportamento foi mensurado em segundos, com o auxílio de um cronômetro. As respostas podem ser intermitentes, por isso, o cronômetro era parado e ativado conforme o comportamento do animal. Cada animal foi observado por um total de 60 segundos.

3.5 Coleta De Amostras

Os animais foram anestesiados com ketamina (100mg/kg, i.p.) e xilazina (10mg/kg, i.p.) por via subcutânea e perfundidos após não apresentarem qualquer sinal reflexo. Para a realização dos experimentos de qRT-PCR e Western Blotting, o animal foi perfundido apenas com tampão fosfato (PBS pH 7,2-7,4), em temperatura ambiente, por 2 minutos (5 mL/min). Posteriormente, foi realizada uma incisão póstero-mediana no dorso do animal, seguida de abertura, por planos, até a exposição das lâminas ósseas da coluna vertebral. Após laminectomia, a região medular foi exposta, permitindo a coleta da medula.

3.6 Western Blotting

O lisado de tecido de medula espinhal foi preparado com tampão de lise (Pierce RIPA buffer, Thermo Scientific) com inibidor de protease (complete cocktail) e inibidor de fosfatase PhosSTOP, ambos da Roche Applied Science. As amostras foram quantificadas (kit de BCA, sigma) de acordo com as instruções do fabricante e de 20-40ug de proteínas foram utilizadas na eletroforese. Para separar as amostras por peso molecular foi realizada eletroforese em gel de poliacrilamida SDS e transferidas da membrana de nitrocelulose (Merck Millipore) e bloqueadas por 1 hora a temperatura ambiente com leite 5%. Para a marcação foram utilizados os seguintes anticorpos diluídos em BSA 5%: O-Linked Nacetylglucosamine (RL2, abcam, 1:1000 cat. ab2739), Anti-O-

GlcNAc-Transferase (TI-14, Sigma Aldrich, 1:3000, cat. O6014). Anticorpos anti-mouse e anti-rabbit com peroxidase (Cell signaling) foram utilizados na concentração de 1:5000 diluídos em leite 5%/TBST. O sinal foi detectado com ECL prime (GE Healthcare) no Chemidoc imaging systems (Bio-Rad Laboratories).

3.7 Reação Em Cadeia Da Polimerase-Transcriptase Reversa Em Tempo Real:

Os camundongos C57BL/6 foram submetidos a cirurgia de SNI, após a cirurgia nos dias 3, 7, 10, 14, e 21, além do grupo controle, foram coletados a região dorsal ipsi lateral da medula espinhal para avaliação da expressão gênica. A transcrição de RNAm para cDNA, foi feita por meio da atividade da enzima transcriptase reversa MultiScribe®, utilizando-se 300-500 ng de RNAm total, e os demais reagentes fornecidos pelo kit de transcrição reversa de RNAm em cDNA - High-Capacity (Invitrogen Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA). Para essa reação foram utilizados tempos e temperaturas estabelecidos pelo fornecedor do Kit. A reação quantitativa do PCR em tempo real foi feita no aparelho stepOne Plus Real-Time PCR System, usando o sistema de fluorescência SYBR-green® Master Mix (Invitrogen, Carlsbad, USA). O PCR em tempo real foi executado com volume final de 6,25 µL usando SYBR-green (3,125µL SYBR-green® + 0,25 µL de primer sequência sense + 0,25 µL primer sequência anti-sense + 1,625 µL de água) e 1 µL de amostra de cDNA. A placa na qual esses reagentes e amostras foram pipetados foi mantida a 95 °C (10 min), e mais 40 ciclos de 94°C (1 min), 56° C (1 min) e 72° C (2 min). A curva de dissociação, para as amplificações com SYBR®, foram analisadas a 65-95°C, para verificar se apenas um produto foi amplificado. Amostras que tiveram mais de um pico foram excluídas. Os resultados foram analisados através do método comparativo de “cycle threshold” (CT) ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). Os níveis de expressão relativa dos genes alvos foram normalizados com base 41 na expressão de

GAPDH como controle endógeno. As sequências dos pares de primers (camundongo) utilizados estão demonstradas na tabela abaixo.

GENE	TIPO DE PRIMER	SEQUÊNCIA 5' --> 3'
Gapdh	Sense	<i>CATCTTCTTGTGCAGTGCCA</i>
	Antisense	<i>CGGCCAAATCCGTTAC</i>
Hk1	Sense	<i>CGGAATGGGGAGCCTTTGG</i>
	Antisense	<i>GCCTTCCTTATCCGTTTCAATGG</i>
Hk2	Sense	<i>TGATCGCCTGCTTATTCACGG</i>
	Antisense	<i>AACCGCCTAGAAATCTCCAGA</i>
Pdk1	Sense	<i>GGACTTCGGGTCAGTGAATGC</i>
	Antisense	<i>TCCTGAGAAGATTGTCGGGGA</i>
Pfkfb3	Sense	<i>CCCAGAGCCGGGTACAGAA</i>
	Antisense	<i>GGGGAGTTGGTCAGCTTCG</i>
Pkm1	Sense	<i>GCTGTTTGAAGAGCTTGTGC</i>
	Antisense	<i>TTATAAGAGGCCTCCACGCT</i>
Pkm2	Sense	<i>TCGCATGCAGVACCTGATT</i>
	Antisense	<i>CCTCGAATAGCTGCAAGTGGTA</i>
Gfat1	Sense	<i>CAGTCGGCAGTTCTATATCAAG</i>
	Antisense	<i>CGGCAGTCGCTTCAGTCC</i>
Gfat2	Sense	<i>TGGGAAACTCTCCATTACCC</i>
	Antisense	<i>GGAGCACTGTGTTGGTCTCA</i>
OGT	Taqman	Mm00507317_m1
Oga (MgeA5)	Taqman	Mm01194147_m1

3.8. Imunofluorescência

Os animais foram submetidos a cirurgia de SNI, para coleta da medula os animais foram anestesiados e perfundidos com PBS 1x e subsequentemente, com solução contendo paraformaldeído (PFA 4%, pH 7,3-7,4). Posteriormente, a região (L3-L5) da medula espinal foi extraído mantidos por mais 24 horas em solução de PFA 4% e transferidos para uma solução de contendo 30% de sacarose, na qual foram incluídos em meio para congelamento Tissue-Tek® O.C.T.TM (Sakura Finetek), congelados em gelo seco e estocados a -70 °C. As medulas foram cortadas em secções de 12µm de espessura. Para execução da imunofluorescência as lâminas contendo as secções de medula foram fixadas em uma câmara de vácuo por 30 minutos, posteriormente foram mergulhadas em uma solução de glicina 0,1M durante 30 minutos para retirada completa dos grupos aldeídos, em seguida foram submetidas a 3 lavagens de 5 minutos em PBS 1X e incubados com solução contendo 1% de BSA e 0,1% Triton-X, para bloqueio de ligações inespecíficas e permeabilização dos tecidos. Após 1 hora de bloqueio/permeabilização, os cortes foram incubados com anticorpos primários anti-NeuN, anti-IBA1, anti-GFAP, anti-OGT (1:1000, NeuN Clone A60 conj Alexa488, Millipore, MAB377X-mouse/ 1:200 , Iba1, Novus, NB100-1028, goat/ 1:1000, GFAP conjugado Cy3, Millipore, MAB3402C3-mouse /1:500, TI-14 , Sigma Aldrich, 1:3000, cat. O6014). Todos os anticorpos foram diluídos em solução de bloqueio e mantidos a 4°C em câmara úmida, *overnight*. Após mais um ciclo de lavagens, as secções foram incubadas com anticorpos secundários específicos (Donkey anti-rabbit, Invitrogen, A21207 Alexa 594 -1:400/ Donkey anti-rabbit, Invitrogen, A21206 ,Alexa488 , 1:400/ Donkey anti-mouse Invitrogen, A21203, 1:400 /Donkey anti-mouse, Invitrogen, A21202 1:400, Donkey anti-goat, Invitrogen, A11055, 1:400) durante 2 hoas a temperatura ambiente. Por fim as Lâminas foram submetidas a novo ciclo de lavagens, montada utilizando o meio de

montagem VECTASHIELD® Antifade Mounting Medium with DAPI ou Fluormount™. Todas as lâminas foram posteriormente visualizadas e fotografadas em microscópio confocal (SP5, Leica, Wetzlar, Alemanha).

3.9 Sorting Celular

Suspensões celulares provenientes da medula espinal (extraída na porção L3-L6) de camundongos naive foram analisadas por citometria de fluxo. Primeiramente, os tecidos em questão foram coletados de animais previamente perfundidos transcardialmente com tampão fosfato salino (PBS 1M, essa concentração foi utilizada durante todos os procedimentos). Em seguida, para isolamento das células do baço, o tecido foi macerado com PBS 1X (pH 7.2) e filtrados em cell strainer de 70 μ M (BD Biosciences, San Diego, CA, EUA) para obtenção de uma solução de células únicas (single cell suspension). As células obtidas foram centrifugadas a 500 x g durante 10 minutos a 4°C e, posteriormente, incubadas com tampão de lise de hemácias a temperatura ambiente durante 4 minutos. Por fim, as células foram lavadas e ressuspensas em PBS 1X e a quantificação e análise de viabilidade celular foram feitas utilizando-se Azul de Trypan em Câmara de Neubauer. Para isolamento das células da medula espinal, os órgãos coletados foram cortados em pequenos pedaços e, posteriormente, incubados em solução contendo 2% de collagenase do tipo II (Sigma- -Co, Saint Louis, EUA) por 1 hora a 37°C. A reação da enzima foi bloqueada com PBS 1X contendo 10% de soro fetal bovino. Em seguida, os órgãos foram macerados em cell strainer de 40 μ m, centrifugado a 500 x g por 10 minutos a 4°C e ressuspensos em PBS 1X para a quantificação e análise de viabilidade celular em câmara de Neubauer. Uma vez obtida as suspensões celulares dos órgãos em questão, as células foram incubadas por 15 minutos, a temperatura ambiente e sob abrigo da luz, com anticorpo monoclonal específicos para a moléculas de superfície a ser analisada. O anticorpo utilizado para a marcação extracelular de astrócitos

foi anti-ACSA, no caso dos macrófagos e micróglia não foi necessário a utilização de anticorpos uma vez que o animal utilizado já possuía a proteína fluorescente verde acoplado ao receptor de interesse (CX3CR1^{GFP/+}). Após incubação, as células foram lavadas 2 vezes com PBS 1X e então adquiridas no aparelho BD FACSVerse/FACSAria III (BD Biosciences).

Os sortings celulares foram realizados no aparelho BD FACSAria III (BD Bioscience). Células CX3CR1⁺ e ACSA⁺, foram isoladas a partir do baço e medula espinhal (L3-L6) de animais wild type naive. As células obtidas foram ressuspensas em PBS 1x e prontas para serem adquiridas no FASCAria III, uma vez que utilizamos animais geneticamente modificados (CX3CR1^{GFP/+}), os quais já possuem o receptor de interesse marcado com uma proteína fluorescente verde (GFP). As células obtidas foram ressuspensas em PBS 1x e incubadas por 15 minutos com anticorpo anti-ACSA, não sendo necessário a utilização de anticorpos anti-CX3CR1, uma vez que utilizamos animais geneticamente modificados (CX3R1^{GFP/+}). As populações de células CX3CR1⁺ (macrófago/micróglia) e ACSA⁺ (astrócitos) isoladas de ambos os órgãos foram armazenadas em tampão de lise para posterior extração de RNA (RNeasy Micro Kit, Qiagen, Hilden, Alemanha) e análise por PCR em tempo real.

3.10 Tratamento Com Tamoxifeno

Para que os animais GFAP-CreERTM/Ogt^{lox P/Y} se tornem especificamente OGT Knockout em astrócitos é necessário receber uma dose de tamoxifeno, para que a possa migrar para o núcleo e executar a clivagem da sequência codificadora de OGT . Assim primeiramente é avaliado o comportamento dos animais, para identificar qualquer alteração do comportamento do animal em função do tamoxifeno injetado, após avaliação foi administrado 1,2mg de tamoxifeno por animal, diluído em 100 µl de óleo de milho uma dose diária, durante 5 dias, via subcutânea. Após o tratamento os animais foram

novamente submetidos a avaliação comportamental, em seguida foram submetidos a cirurgia de SNI e nos dias 3,7,10, 14 e 21 o comportamento foi avaliado novamente.

3.11 Coleta E Preparo Das Amostras Para Genotipagem

Foram coletadas para a genotipagem dos camundongos amostra de tecido (5mm) da ponta da calda, sob anestesia, para extração do DNA. As amostras foram digeridas em tampão lise acrescido de proteinase K (20ng/ml), no banho maria a 55 °C, overnight. Após serem retiradas do banho, estas foram centrifugadas a 15.000 rpm por 5min. para a precipitação dos restos celulares. Os sobrenadantes de cada amostra foram pipetados separadamente em tubos novos e adicionados do solvente orgânico isopropanol para a condensação dos DNAs. Estas amostras foram levadas a nova centrifugação a 13.250 rpm por 10min. para formação de pellets. Dessa forma, com os respectivos DNAs acondicionados no fundo de cada tubo foram ressuspensos em tampão T.E (Tris-EDTA) após descarte dos seus sobrenadantes. Cada amostra foi preparada na concentração 20-50ng/μl para reação em termociclador. Todas as amostras foram quantificadas em equipamento Nanodrop Spectrophotometer ND-1000.

3.11.1 PCR

As reações de amplificação foram preparadas para um volume final de 12,5 μL compreendendo 4,95 μl de H₂O, 6,25 μL de Go Taq[®] Green Master Mix, 0,3 μl de cada primer (GFAP –Cre e OGT) (20 μM), 1 μL de amostra (20-50 ng/μl) de DNA. Para a amplificação foram utilizadas as etapas correspondentes a configuração do termociclador (VERITI[™] 96 – Well Thermal Cycler) específica para cada primer (GFAP-Cre e OGT), como desnaturação a 94 °C por 5 min, seguido de 35 ciclos térmicos de 94 °C por 30 s,

60 °C por 30 s e 72 °C por 1 min, e extensão por 7 min a 72 °C. Os produtos de amplificação foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 3% (m/v), corados com SYBR® Safe 0,01% (v/v) e revelados em equipamento Chemidoc.

GENE	TIPO DE PRIMER	SEQUÊNCIA 5' --> 3'
GFAP-Cre	Sense	<i>GCCAGTCTAGAACACTCCTT</i>
	Antisense	<i>TCCAGTAACATGTCCATCAG</i>
OGT	Sense	<i>CATCTCTCCAGCCCCACAAAC TG</i>
	Antisense	<i>GACGAAGCAGGAGGGGAGAGC</i>

3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

Os resultados foram expressos como a média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.) por grupo de quatro a oito animais. Conforme indicado, a análise dos resultados foi feita pelo teste de análise de variância (ANOVA) de uma via (one way), seguindo do teste (post-hoc) de Bonferroni, para comparação entre os diferentes grupos. Para se comparar dois grupos de variáveis não-pareadas, utilizou-se o teste t de student. As diferenças foram consideradas significativas para valores de $P < 0,05$. A realização das análises estatísticas citadas e confecção dos gráficos foi realizada utilizando-se o programa GraphPad Prism 7.0

4. RESULTADOS

4.1 PADRONIZAÇÃO DO MODELO DE SNI

Com o objetivo de padronizar as respostas nociceptivas (alodinia mecânica/fria) foi induzido o modelo de neuropatia SNI em camundongos C57BL/6 selvagens. Foram avaliados o limiar mecânico de retirada de pata (Figura 3-a), a frequência de retirada de pata (Figura 3-b) e resposta ao frio (Figura 3-c) nos dias 3, 7, 10 e 14

Na Figura 1 é possível observar que após o terceiro dia da indução de SNI houve redução gradual do limiar mecânico de retirada de pata (log mg) que se estendeu até o 14º dia, corroborando os dados apresentados por Decosterd (Decosterd and Woolf 2000). Esses dados demonstram que o modelo de SNI é capaz de induzir alodinia mecânica. Na figura 2 também é possível visualizar o estabelecimento de alodinia mecânica após indução de SNI, uma vez que houve aumento da frequência de retirada de pata após estimulação com filamentos de Von Frey (0,008g).

A Figura 3 demonstra que, após a indução do modelo SNI, houve o aumento do tempo de respostas nociceptivas, mensuradas em segundos, após a instilação da acetona na região inferior da pata posterior direita de camundongos C57BL/6.

Todos os testes comportamentais realizados após indução de SNI corroboraram com dados do modelo disponíveis na literatura, permitindo assim o uso de SNI como modelo de neuropatia periférica.

Figura 3. Decurso temporal do limiar de retirada de pata (log limiar mg) durante 14 dias em resposta a indução do modelo de SNI. Animais C57/BL6 foram submetidos a cirurgia de SNI e o limiar de retirada de pata (a), frequência de retirada de pata, (respostas a 10 estímulos contínuos, com filamento Von Frey 0,008g) (b), e Alodinia ao Frio (tempo de 60 segundos de avaliação das respostas nocíptivas do animal após instilar na área central da superfície plantar da pata posterior com auxílio de uma seringa de 1 mL, sem agulha) (c) foram avaliados através de teste comportamental. Two-way ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni, **** $p < 0,0001$ em relação ao grupo Sham ($n=5$).

4.2 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL DE ENZIMAS METABÓLICAS DURANTE A NEUROPATIA INDUZIDA POR SNI

Diversas doenças neurodegenerativas, como doença de Alzheimer (DA), doença de Huntington (DH) e doença de Parkinson (DP) têm sido associadas a disfunções metabólicas. Trabalhos, tanto clínicos como experimentais, indicam que muitos desses distúrbios neurodegenerativos frequentemente apresentam uma disfunção metabólica coexistente que pode exacerbar os sintomas neurológicos. Esses distúrbios apresentam acúmulo de produtos de reações oxidativas que levam a danos disseminados por lipídios e proteínas. Embora distúrbios metabólicos associados a doenças do sistema nervoso central estejam sendo estudados, estudos associando desequilíbrio metabólico e neuropatia são negligenciados pela comunidade científica. Sendo assim o primeiro passo foi avaliar o perfil de expressão gênica de enzimas da via glicolítica na fisiopatologia da neuropatia induzida por SNI.

Deste modo, foi induzido SNI em camundongos C57BL/6. Após 3,7,10,14 e 21 dias após a cirurgia realizamos análise gênica de enzimas da via glicolítica da região dorsal ipsi lateral da medula espinhal através de q-PCR.

Inicialmente foi realizado a avaliação da expressão gênica da primeira enzima da via glicolítica a Hexoquinase (HK) 1 e 2, que também possui papel fundamental em diversas vias metabólicas. Os resultados obtidos demonstraram aumento significativo na expressão gênica da hexoquinase 1 e 2 após indução de neuropatia (SNI)(Figura 4), sugerindo que a hexoquinase 1 e 2 pode estar modulando alguma via metabólica durante a neuropatia.

Considerando-se que a Hexoquinase é a primeira enzima da via glicolítica, avaliamos as expressões gênicas de enzimas que estão downstream da hexoquinase na via glicolítica, a piruvato quinase (PKM), frutose-6-fosfato, 2-quinase / frutose-2, 6-

bisfosfatase (PFKFB3), Piruvato Desidrogenase Quinase 1(PDK-1), (Figura 5). Diferentemente da hexoquinase, não houve aumento significativo na expressão gênica destas enzimas (Figura 4), sugerindo que possivelmente outra via que tem em comum a hexoquinase poderia estar sendo modulada durante a neuropatia.

Figura 4. Aumento da expressão gênica das hexoquinases 1 e 2 durante o desenvolvimento da neuropatia. Expressão gênica relativa da hexoquinase 1 (a) e 2 (b) da região dorsal ipsi lateral da medula espinhal durante indução de neuropatia por SNI. Quantificação por qPCR. One-way ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni, * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0005$, **** $p < 0,0001$ em relação ao grupo basal ($n=6$).

Figura 5. Expressão gênica relativa de enzimas da via glicolítica durante o decurso temporal da neuropatia. Animais C57/BL6 foram submetidos a cirurgia de SNI, após 3,7,10,14 e 21 dias a região dorsal ipsi lateral da medula espinhal foi coletada para avaliação da expressão gênica de Pfkfb3 (a), Pkm1 (b), Pkm2 (c) e Pdk1 (d), através de qPCR. Os dados foram analisados através de One-way ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni, * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0005$, **** $p < 0,0001$ em relação ao grupo basal ($n=6$).

4.3 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL DE ENZIMAS DA VIA DAS HEXOSAMINAS DURANTE A NEUROPATIA INDUZIDA POR SNI

Tendo em vista que a via das hexosaminas é uma via paralela a via glicolítica, e que a hexoquinase é uma enzima em comum das duas vias, propomos avaliar a expressão gênica das enzimas da via das hexosaminas durante a neuropatia induzida por SNI na região dorsal ipsi lateral da medula espinhal, uma vez que a via das hexosaminas tem demonstrado ter papel importante no sistema nervoso central.

Assim, foram avaliadas a expressão gênica de GFAT1 e GFAT2, OGT e OGA através de PCR em tempo real (qRT-PCR). Os resultados obtidos mostraram um aumento significativo na expressão gênica de GFAT 1 e 2 (Figura 6) nos dias 7,10,14 e 21 após indução de SNI, permitindo sugerir que GFAT 1 e 2 poderiam modular a via das hexosaminas levando a um aumento de O-GlcNacilação de proteínas envolvidas na modulação da neuropatia. Não houve aumento significativo da expressão gênica de OGT e OGA (Figura 6 C-D).

Estudos recentes mostraram (Edfors et al. 2016; Gry et al. 2009), que a correlação entre os níveis de RNA mensageiro e proteína pode não ser equivalente, portanto embora os resultados de expressão gênica de OGT não tenham apresentado aumento, partimos para averiguar se os níveis de expressão proteica de OGT e sua atividade também não variaram durante a neuropatia.

Figura 6. Aumento da expressão gênica de GFAT1 e GFAT2 após indução de neuropatia. Animais C57/BL6 foram submetidos a cirurgia de SNI, após 3,7,10,14 e 21 dias a região dorsal ipsi lateral da medula espinhal foi coletada para avaliação da expressão gênica de GFAT1 (a), GFAT2 (b), OGT (c) e OGA (d) através de qPCR. Os dados foram analisados através de One-way ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni, * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0005$, **** $p < 0,0001$ em relação ao grupo basal ($n=6$).

5.4 EXPRESSÃO PROTEICA DE OGT E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DURANTE O DESENVOLVIMENTO DA NEUROPATIA

Para determinar se existe alterações na expressão proteica de OGT e de sua atividade, foi realizado western blotting da região dorsal ipsi lateral da medula espinhal durante o decurso temporal da neuropatia.

Os resultados obtidos demonstraram que não há aumento da expressão proteica de OGT (Figura 7), concordando com o resultado de q-PCR. No entanto, ao avaliar a atividade de OGT, foi possível observar que houve um aumento significativo de ligação de N-acetilglucosamina em proteínas no décimo dia após indução de SNI (Figura 8), ou seja houve aumento de O-GlcNacilação após indução de SNI, indicando envolvimento da O-GlcNacilação na neuropatia.

Figura 7. Não houve aumento significativo da expressão de OGT durante o desenvolvimento de neuropatia. Animais C57/BL6 foram submetidos a cirurgia de SNI, após 3,7,10,14 e 21 dias, a região dorsal ipsi lateral da medula espinhal foi coletada para avaliação da expressão proteica de OGT através de Western Blotting. Os dados foram analisados através de One-way ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni, * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0005$, **** $p < 0,0001$ em relação ao grupo basal ($n=6$).

A **B**

Figura 8. Aumento da atividade de OGT durante a neuropatia. Animais C57/BL6 foram submetidos a cirurgia de SNI, após 3,7,10,14 e 21 dias, a região dorsal ipsi lateral da medula espinhal foi coletada para avaliação da atividade de OGT através de Western Blotting. Os dados foram analisados através de One-way ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni, * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0005$, **** $p < 0,0001$ em relação ao grupo basal (n=6).

4.5 AVALIAR CÉLULAS DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL QUE EXPRESSAM OGT

Uma vez demonstrado o aumento de O-GlcNacilação no desenvolvimento da neuropatia, foi realizado um experimento de imunofluorescência para determinar quais células do sistema nervoso central expressam OGT, para uma possível correlação de células do sistema nervoso central e O-GlcNacilação, com a neuropatia.

Considerando que o décimo dia foi o pico de O-GlcNacilação, após 10 dias de cirurgia de SNI, a medula espinhal (L3-L6) foi coletada para identificação das células que expressam OGT por meio de dupla marcação de imunofluorescência.

A análise de localização da enzima OGT por imunofluorescência sugere que esta enzima não está sendo expressa em neurônios e células microgliais, já que não foi observada co-localização desta enzima com os marcadores de diferenciação celulares *neuronal nuclei* (NeuN) e *ionized calcium-binding adapter molecule-1* (IBA-1), respectivamente (Figura 9 a-b). Diferentemente dos neurônios e micróglia, os resultados sugerem uma co-localização da enzima OGT com o marcador de astrócitos *glial fibrillary acidic protein* (GFAP) (Figura 9-c), o que nos indica que os astrócitos expressam OGT, célula com papel expressivo nos modelos de neuropatia (Ji et al. 2006; Hofstetter et al. 2005; J and Carlton 1994). Esses dados são corroborados com estudos que sugerem que proteínas expressas por astrócitos são ou podem ser O-GlcNaciladas (Karababa et al. 2014; Benjamin Kacerovsky and Murai 2016; Mao et al. 2015).

A

B

C

Figura 9. A OGT está expressa em astrócitos na medula espinhal. Imunocoloração de OGT (verde) e neurônio (NeuN, vermelho - a), micróglia (IBA-1, vermelho b), astrócitos (GFAP,vermelho - c) em secções da região L3-L6 da medula espinhal para verificar a colocalização de OGT em células do sistema nervoso central. Imagens em microscópio confocal SP5.

Para reforçarmos os dados anteriores, de que a OGT está sendo expressa majoritariamente em astrócitos, foram isoladas células positivas para os marcadores CX3CR1 (micróglia) e Acsa (astrócitos) por *sorting* como esquematicamente demonstrado na figura 10-A. Em seguida, foi realizado RT-qPCR para avaliação da expressão gênica de *Cx3cr1* e *Gfap* e *Ogt* no tecido previamente coletado (medula espinhal). A Figura 10 B e C demonstram a pureza das células que foram isoladas. Corroborando com os dados de imunofluorescência, na figura 10-D é possível afirmar que OGT não está sendo expressa em micróglia, no entanto há uma expressão gênica significativa de OGT em astrócitos.

A

Figura 10. A OGT é expressa em astrócitos. Camundongos CX3CR1GFP/+ naive foram anestesiados e perfundidos transcordialmente com PBS 1X. Medula espinal (L3-L5) foram coletados para separação das células CX3CR1+ e ACSA+ presentes nesse tecido por sorting, realizado no aparelho FACSaria III (BD Bioscience). As células obtidas foram submetidas ao ensaio de RT-qPCR para análise da expressão gênica dos alvos: Cx3cr1, Gfap e Ogt. Os dados foram separados por grupo experimental e expressos em barra. n=4-5, ***p

4.6 OGT PRESENTE EM ASTRÓCITOS POSSUI PAPEL NA NEUROPATIA.

Uma vez determinado a presença de OGT no astrócito, o próximo passo foi avaliar o impacto da presença de OGT no astrócito na neuropatia. Para isso, animais OGT KO condicionais para astrócitos foram utilizados.

Primeiramente foi realizado uma padronização do animal GFAP-CreERTM/Ogt^{lox}^{P/Y}, no qual os camundongos foram tratados diariamente com tamoxifeno durante 5 dias, em seguida os animais foram eutanasiados para coleta da medula espinhal, no intuito de verificar se o animal expressava OGT no sistema nervoso central. Como é possível verificar na **Figura 12** houve redução significativa da expressão de OGT nos animais KO condicionais para astrócitos, acreditamos que não houve extinção total da OGT pois esta enzima demonstra ter expressão baixa em outras células.

Assim o próximo passo foi avaliar o desenvolvimento de hipersensibilidade e alodinia resultante da indução de SNI, em animais OGT KO condicionais para astrócitos. Para isso, em camundongos GFAP-CreERTM/Ogt^{lox}^{P/Y} realizamos os testes comportamentais de limiar e frequência de retirada de pata, e o teste a frio no primeiro dia de experimento para avaliar o hiperalgesia e alodinia basal dos animais, subsequentemente um grupo foi tratado com tamoxifeno enquanto outro grupo recebeu veículo, durante 5 dias recebendo uma dose diária, após o tratamento finalizado, os testes comportamentais foram realizados novamente, para averiguar se o tamoxifeno por si só não causou hiperalgesia ou alodinia. Uma vez que não houve alteração comportamental dos animais após tratamento com tamoxifeno, os dois grupos foram submetidos a cirurgia de SNI, e foram realizados novos testes comportamentais nos dias 3,7,10,14,21.

Os resultados obtidos foram curiosos, a OGT expressa em astrócitos parece estar relacionada com alodinia mecânica, uma vez que não houve diferença significativa na avaliação do limiar nociceptivo mecânico nem no teste de acetona (Figura 12 A e C), no entanto o teste de frequência de retirada de pata, o qual avalia especificamente sutis alterações que estão relacionadas a alodinia mecânica apresentou uma redução significativa no número de vezes que o animal retirou a pata (Figura 12 B), sugerindo papel da OGT na alodinia mecânica.

Figura 11. Houve redução da expressão de OGT na medula espinhal após tratamento com tamoxifeno em camundongos GFAP-CreERTM/Ogtlox P/Y. Teste-t não pareado, * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0005$, **** $p < 0,0001$ em relação ao grupo basal (n=3).

A

B

C

Figura 12. Camundongo Knockout para OGT em astrócitos diminuiu a frequência de retirada de pata em comparação com o Naive após indução de SNL. Limiar mecânico (A), Frequência de retirada de pata (B), Sensibilidade ao frio (C), em camundongos GFAP-CreERTM/Ogt^{lox P/Y} - TMX (vermelho) e GFAP-CreERTM/Ogt^{lox P/Y} - veículo (azul). B medida basal. Dados representados em média $\pm$ erro padrão da média (EPM), com n=5. Análise estatística two-way ANOVA, de medidas repetidas seguidos de pós teste Bonferroni.

5.DISSCUSSÃO

DISCUSSÃO

Lesões no sistema nervoso periférico (provocadas por quimioterápicos, trauma, infecções, disfunções metabólicas ou doenças de caráter autoimune), estimulam terminações no sistema nervoso central a liberarem moduladores gliais, incluindo neurotransmissores e citocinas pró-inflamatórias, os quais atuam sobre micróglias e astrócitos no corno dorsal da medula espinhal causando um processo neuroinflamatório (Malcangio et al. 2013). Quando ativados, micróglias e astrócitos passam por mudanças morfológicas e funcionais, principalmente relacionadas ao seu papel metabólico, o que pode alterar o funcionamento dos neurônios no sistema nervoso central (Austin and Moalem-Taylor 2010). Adicionalmente, estas células ativadas liberam neuromoduladores que promovem alterações transcricionais, pós-traducionais em neurônios, ocasionando um processo conhecido como sensibilização central (Baquer et al. 2009; Basbaum et al. 2009). A sensibilização central é considerada um mecanismo importante tanto na indução quanto na manutenção da dor neuropática, logo contribui para hiperalgesia e alodinia (Clark and Malcangio 2014).

As alterações metabólicas durante a neuropatia em células do sistema nervoso central são pouco conhecidas. Portanto iniciamos nossos estudos pela avaliação dos níveis de expressão de algumas enzimas da via glicolítica. Contudo, observamos alterações nos níveis de expressão genica apenas das hexoquinases I e II (um dos passos limitantes da glicólise), indicando haver um acúmulo de metabolitos (frutose 6-fosfato) que pode estar sendo desviado para vias metabólicas alternativas. Uma vez que verificamos que enzimas da via glicolítica não estão tendo sua expressão gênica alterada, avaliamos as vias paralelas, que tem em comum a hexoquinase tal como a via das hexosaminas. Esta via, desvia a frutose-6P da via glicolítica para a produção de N-acetilglucosamina. Por ser uma via que possui papel em diversas doenças neurodegenerativas, avaliamos as enzimas

da via das hexosaminas no decurso temporal da neuropatia. Observamos alterações na expressão gênica das primeiras enzimas da via das hexosaminas as GFAT 1 e 2. Estudos de caracterização da enzima GFAT demonstraram diferentes distribuições teciduais de GFAT 1 e GFAT 2. Em especial GFAT2 foi expresso em todo sistema nervoso central, principalmente na medula espinal, enquanto GFAT 1 é menos expressa (Oki et al. 1999). Esses dados corroboraram com os dados que obtivemos, uma vez que a expressão basal de GFAT1 na medula espinal é baixa, e após indução de SNI ocorreu um aumento significativo da expressão gênica dessa proteína. Enquanto GFAT 2 possui nível de expressão gênica basal mais elevado que GFAT1, mas após indução de SNI também tem aumento significativo de GFAT 2, indicando um desvio metabólico para a via das hexosaminas.

Uma vez avaliada a expressão gênica das primeiras enzimas da Via das hexosaminas, o próximo passo foi avaliar a expressão gênica e proteica de OGT, a enzima responsável por promover a modificação pós traducional em proteínas do sistema nervoso central. Contudo não foi observada a expressão gênica e proteica de OGT após indução de neuropatia, no entanto, houve aumento significativo de sua atividade. Sugerindo que para que ocorra aumento de O-GlcNacilação durante o desenvolvimento de neuropatia, os níveis basais OGT não precisam aumentar, o que nos permite questionar se a OGT necessitaria de um estímulo para ser ativada, como por exemplo o aumento níveis de glutamato. Uma vez que ocorre lesão no sistema nervoso periférico vários mediadores pró inflamatórios são produzidos por células da glia, levando a uma hipersensibilização neuronal. Essa hipersensibilização ocorre pela expressão de uma variedade de canais iônicos e receptores nos neurônios, que promovem a transmissão de sinais, através de neurotransmissores, como o glutamato, levando a excitabilidade neuronal. Estima-se que 80-90% da captação extracelular de glutamato é através de transportadores de astrócitos,

onde será convertido em glutamina pela enzima glutamina sintetase (Barros et al. 2018). Sendo assim considerando que a glutamina é usada como um doador de amino para a conversão de frutose-6 fosfato em glucosamina-6-fosfato, nos questionamos se o excesso de glucosamina poderia estar colaborando para o desvio para a via das hexosaminas. Portanto o próximo passo foi verificar se a OGT estava sendo expressa majoritariamente em astrócitos. Corroborando com nossa hipótese os experimentos demonstraram que OGT está sendo expressa em astrócitos. Assim, o próximo passo foi verificar se a OGT nos astrócitos está envolvida com a dor neuropática. Desta forma, utilizamos animais Knockout condicionais de OGT em astrócitos e surpreendentemente o teste comportamental que nos permite perceber diferenças sutis no comportamento do animal foi positivo. Como só verificamos alterações significativas no teste comportamental de mudanças sutis, sugerimos que a OGT em astrócitos pode estar mais relacionada a alodinia mecânica. Uma vez que a alodinia mecânica é o sintoma relacionado a estímulos que normalmente não são nocivos, mas que após o desenvolvimento da neuropatia, o estímulo passa a ser nocivo.

Nesse trabalho focamos na caracterização da O-GlcNacilação na neuropatia, mecanismos não foram abordados. No entanto existem diversas proteínas envolvidas com os processos fisiopatológicos da dor que podem ser O-GlcNaciladas e podem estar envolvidas na modulação da dor, como é o caso da quinase N-terminal c-jun (JNK). A JNK é ativada persistentemente em astrócitos espinhais em uma condição de dor neuropática (Ji et al. 2006). Um trabalho publicado em 2002 demonstrou que a ligação parcial do nervo induziu fosforilação da JNK (Quirion et. al 2002). Uma vez que a fosforilação ocorre no mesmo sitio de O-GlcNacilação, e já existem trabalhos demonstrando que a JNK pode ser O-GlcNacilada (Tai et. al 2004), a O-GlcNacilação dessa proteína pode ser um mecanismo interessante a ser estudado no âmbito de dor. Além

disso a infusão espinal de inibidores da JNK pode reverter a alodinia mecânica, corroborando com nossos dados que correlaciona a OGT expressa em astrócitos com a alodinia.

Outra proteína que está envolvida com os processos fisiopatológicos da dor e também pode ser O-GlcNacilada é a proteína de ligação ao elemento responsivo cAMP (CREB)(Rexach et al. 2012). A proteína CREB é um fator de transcrição que está envolvida em diversos processos neuronais, variando desde sobrevivência e desenvolvimento neuronal até comportamentos adaptativos complexos, como memória de longo prazo e dependência de drogas (Kida 2002; Sakamoto 2011; Lonze 2002). Um estudo publicado em 2005 demonstrou que a ativação da via ERK/CREB na medula espinal contribui para a dor neuropática crônica induzida por lesão constritiva em ratos. Neste trabalho foi proposto que o influxo de Ca^{2+} induzido por ativação do receptor glutamatérgico (NMDA) pode desencadear uma fase de fosforilação persistente de CREB, a qual é mediada por uma cascata de sinais extracelulares da proteína ERK, que estão envolvidos no desenvolvimento e manutenção da dor. Uma vez que já existem estudos demonstrando que a proteína CREB pode ser O-GlcNacilada(Rexach et al. 2012), e considerando que a O-GlcNacilação ocorre no mesmo sítio de ligação da fosforilação, a via ERK/CREB poderia ser alvo de estudos correlacionando a O-GlcNacilação e a dor neuropática. Considerando que se a fosforilação persistente de CREB induz o desenvolvimento da dor neuropática, a O-GlcNacilação poderia inibir o desenvolvimento da dor neuropática. No entanto essa hipótese não vai contra o resultado que foram obtidos neste trabalho, pois aparentemente diversas proteínas são O-GlcNaciladas e fosforiladas durante o desenvolvimento da dor neuropática. No balanço geral, o aumento de proteínas O-GlcNaciladas não necessariamente implica que algumas proteínas podem deixar de serem O-GlcNaciladas e serem fosforiladas permanentemente.

Receptores glutamatérgicos também foram correlacionados com a O-GlcNacilação (Taylor et al. 2014). Receptores glutamatérgicos estão presentes principalmente nas membranas de células neuronais e células gliais (Brassai 2015). São responsáveis pela excitação pós-sináptica mediada por glutamato de células neuronais, e são importantes para a comunicação neuronal, formação de memória e aprendizagem. (Linda M 1987; Linda M. 1990; Morales-Alcelay 2005; Xu 2016; Gernot Riedel 2003). Estudos anteriores mostraram que a sinalização do glutamato mediada por receptores glutamatérgicos, pode regular a sensibilidade à dor (Ghalandari-Shamami 2011; Gear 1999, 2009). Em 2016, um estudo sugeriu que a dor neuropática aumenta seletivamente o número de subunidades de GluA1 dos receptores glutamatérgicos do tipo AMPA, promovendo um aumento da fosforilação da Ser845-GluA1. Mais uma vez a fosforilação está envolvida no desenvolvimento da neuropatia. O que nos permite questionar se há aumento da O-GlcNacilação no décimo dia em função de um mecanismo compensatório do organismo, inibindo proteínas que estão envolvidas na patofisiologia da dor.

Vários estudos demonstraram um papel crítico do estresse oxidativo e da neuroinflamação na patogênese da lesão periférica do nervo (Areti et al. 2016; Wieseler-Frank 2004). Tais condições promovem a alteração na expressão de vários mediadores que agem diretamente no nervo lesionado, ativando células pró-inflamatórias do DRG e medula espinhal causando dor persistente (Robert Myers 2006). A regulação dos fatores de transcrição Nrf2 e NF- κ B coordena o estado redox de uma célula saudável, no entanto, sob lesão neuronal, essa homeostase se torna perturbada, induzindo o estresse oxidativo exagerado e neuroinflamação (Kimirishetty 2017). A ativação do Nrf2 endógeno ajuda a eliminar espécies reativas de oxigênio e nitrogênio pela hemoxigenase-1 (HO-1) e glutathiona (GSH) (Helga E. de Vries 2008). Curiosamente o Nrf2 é regulado negativamente pela proteína 1 associada à ECH (KEAP1). A O-GlcNacilação de KEAP1

é necessária para a ubiquitinação e a degradação de NRF2 (Shan Li 2018). Portanto, este poderia ser mais um dos mecanismos envolvendo O-GlcNacilação e dor neuropática.

A O-GlcNacilação pode estar envolvida em diversos mecanismos que causam o desenvolvimento da dor neuropática, seja regulando proteínas pró-inflamatórias ou anti-inflamatórias. No entanto, o que induz a O-GlcNacilação de algumas proteínas ainda é um fator desconhecido. Sabe-se que diversas proteínas envolvidas na fisiopatologia da dor possuem sítios de O-GlcNacilação, e são O-GlcNaciladas durante o desenvolvimento da neuropatia. Portanto, embora estudos complementares sejam necessários, juntos nossos resultados demonstraram que a OGT expressa pelos astrócitos, possui papel na alodinia, o que nos permite acreditar que a O-GlcNacilação exerce regulação de proteínas do sistema nervoso central durante o desenvolvimento da dor neuropática, uma vez que diversas classes proteicas envolvidas na neuropatia são O-GlcNaciladas.

6.CONCLUSÃO

Conclusão

A ausência de OGT em astrócitos reduz o desenvolvimento da dor neuropática no modelo de SNI. Este estudo demonstra pela primeira vez um papel funcional da O-GlcNacilação para o desenvolvimento da dor neuropática, apontando para um possível alvo para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas.

7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anitsi Loaiza, Omar H. Porras, and Luis Felipe Barros. 2009. "Glutamate Triggers Rapid Glucose Transport Stimulation in Astrocytes as Evidenced by Real-Time Confocal Microscopy." *EuroIntervention* 5 (SUPPL. F): 7337–42. <https://doi.org/23/19/7337> [pii].
- Areti, Aparna, Veera Ganesh Yerra, Prashanth Komirishetty, and Ashutosh Kumar. 2016. "Potential Therapeutic Benefits of Maintaining Mitochondrial Health in Peripheral Neuropathies." *Current Neuropharmacology* 14 (6): 593–609. <https://doi.org/10.2174/1570159x14666151126215358>.
- Arnold, C Shane, Gail V W Johnson, Robert N Cole, Dennis L Dong, Michael Lee, and Gerald W Hart. 1996. "Protein Tau Is Extensively Modified with O-Linked." *Biochemistry*, 28741–44.
- Austin, Paul J., and Gila Moalem-Taylor. 2010. "The Neuro-Immune Balance in Neuropathic Pain: Involvement of Inflammatory Immune Cells, Immune-like Glial Cells and Cytokines." *Journal of Neuroimmunology* 229 (1–2): 26–50. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2010.08.013>.
- Baquer, Najma Z., Asia Taha, Pardeep Kumar, P. McLean, S. M. Cowsik, R. K. Kale, R. Singh, and Deepak Sharma. 2009. "A Metabolic and Functional Overview of Brain Aging Linked to Neurological Disorders." *Biogerontology* 10 (4): 377–413. <https://doi.org/10.1007/s10522-009-9226-2>.
- Barros, L. Felipe, Angus Brown, and Raymond A. Swanson. 2018. "Glia in Brain Energy Metabolism: A Perspective." *Glia* 66 (6): 1134–37. <https://doi.org/10.1002/glia.23316>.
- Basbaum, Allan I, Diana M Bautista, Grégory Scherrer, David Julius, Raghavan Murugan, and Author Manuscript. 2009. "Metabolic Dysfunction in Alzheimer's Disease and Related Neurodegenerative Disorders." *Cell*. 2009 October 16; 139(2): 267–284. Doi:10.1016/j.Cell.2009.09.028. 7 (4): 209–17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.09.028>.Cellular.
- Baudoin, Léa, and Tarik Issad. 2014. "O-GlcNAcylation and Inflammation: A Vast Territory to Explore." *Frontiers in Endocrinology* 5 (DEC): 1–8. <https://doi.org/10.3389/fendo.2014.00235>.
- Bélanger, Mireille, Igor Allaman, and Pierre J. Magistretti. 2011. "Brain Energy Metabolism: Focus on Astrocyte-Neuron Metabolic Cooperation." *Cell Metabolism* 14 (6): 724–38. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.08.016>.
- Benjamin Kacerovsky, J., and K. K. Murai. 2016. "Stargazing: Monitoring Subcellular Dynamics of Brain Astrocytes." *Neuroscience* 323: 84–95. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.07.007>.
- Bevan, Mark D., and Charles J. Wilson. 1999. "Mechanisms Underlying Spontaneous Oscillation and Rhythmic Firing in Rat Subthalamic Neurons." *The Journal of Neuroscience* 19 (17): 7617–28. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-17->

07617.1999.

- Bittner, Carla X. 2010. "High Resolution Measurement of the Glycolytic Rate." *Frontiers in Neuroenergetics* 2 (September): 1–11. <https://doi.org/10.3389/fnene.2010.00026>.
- Bond, Michelle R., and John A. Hanover. 2015. "A Little Sugar Goes a Long Way: The Cell Biology of O-GlcNAc." *Journal of Cell Biology* 208 (7): 869–80. <https://doi.org/10.1083/jcb.201501101>.
- Bouhassira. 2008. "Prevalence of Chronic Pain with Neuropathic Characteristics in the General Population." *Pain* 136 (3): 380–87. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2007.08.013>.
- Brassai, A. 2015. "Role of Synaptic and Nonsynaptic Glutamate Receptors in Ischaemia Induced Neurotoxicity." *Brain Research Bulletin* 112: 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2014.12.007>.
- Buse, Maria G. 2007. "Hexosamines, Insulin Resistance, and the Complications of Diabetes: Current Status." *American Journal Of Physiology* 290 (1): 1–15.
- Chen, Yishen, Sridhar Balasubramanyan, Aaron Y Lai, Kathryn G Todd, Peter A Smith, Y Chen, S Balasubramanyan, Lai Ay, Todd Kg, and Smith Pa. 2019. "Effects of Sciatic Nerve Axotomy on Excitatory Synaptic Transmission in Rat Substantia Gelatinosa," 3203–15. <https://doi.org/10.1152/jn.00296.2009>.
- Clark, Anna K., and Marzia Malcangio. 2014. "Fractalkine/CX3CR1 Signaling during Neuropathic Pain." *Frontiers in Cellular Neuroscience* 8 (May): 1–7. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00121>.
- Clark, Anna K., Elizabeth A. Old, and Marzia Malcangio. 2013. "Neuropathic Pain and Cytokines: Current Perspectives." *Journal of Pain Research* 6: 803–14. <https://doi.org/10.2147/JPR.S53660>.
- Cohen, Steven P, and Jianren Mao. 2014. "Neuropathic Pain: Mechanisms and Their Clinical Implications." *BMJ (Clinical Research Ed.)* 348: f7656. <https://doi.org/10.1136/bmj.f7656>.
- Colloca L, Ludman T, Bouhassira D, Baron R, Dickenson A, Yarnitsky D, Freeman R, Truini A, Attal N, Finnerup N. 2017. "HHS Public Access - Neuropathic Pain." *Nat Rev Dis Primers* 3 (doi:10.1038/nrdp.2017.2): 1–45. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.2.Neuropathic>.
- Colloca, Luana, and Fabrizio Benedetti. 2009. "Placebo Analgesia Induced by Social Observational Learning." *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 144 (1–2): 28–34. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2009.01.033>.
- Coull, Jeffrey A. M., Simon Beggs, Dominic Boudreau, Dominick Boivin, Makoto Tsuda, Kazuhide Inoue, Claude Gravel, Michael W. Salter, and Yves De Koninck. 2005. "BDNF from Microglia Causes the Shift in Neuronal Anion Gradient Underlying Neuropathic Pain." *Nature* 438 (7070): 1017–21. <https://doi.org/10.1038/nature04223>.
- Cunha, F. Q., M. M. Teixeira, and S. H. Ferreira. 1999. "Pharmacological Modulation of Secondary Mediator Systems - Cyclic AMP and Cyclic GMP - on Inflammatory Hyperalgesia." *British Journal of Pharmacology* 127 (3): 671–78.

<https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0702601>.

- Decosterd, Isabelle, and Clifford J. Woolf. 2000. "Spared Nerve Injury: An Animal Model of Persistent Peripheral Neuropathic Pain." *Pain* 87 (2): 149–58. [https://doi.org/10.1016/S0304-3959\(00\)00276-1](https://doi.org/10.1016/S0304-3959(00)00276-1).
- Devor, M, R Govrin-Lippmann, and K Angelides. 1993. "Na⁺ Channel Immunolocalization in Peripheral Mammalian Axons and Changes Following Nerve Injury and Neuroma Formation." *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 13 (May): 1976–92. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.13-05-01976.1993>.
- Edfors, Fredrik, Frida Danielsson, Björn M Hallström, Lukas Käll, Emma Lundberg, Fredrik Pontén, Björn Forsström, and Mathias Uhlén. 2016. "Gene-specific Correlation of RNA and Protein Levels in Human Cells and Tissues." *Molecular Systems Biology* 12 (10): 883. <https://doi.org/10.15252/msb.20167144>.
- Francisco, Herb, Katherine Kollins, Neal Varghis, David Vocadlo, Keith Vosseller, and Gianluca Gallo. 2009. "O-GlcNAc Post-Translational Modifications Regulate the Entry of Neurons into an Axon Branching Program." *Developmental Neurobiology* 69 (2–3): 162–73. <https://doi.org/10.1002/dneu.20695>.
- Gao, Xiaoli, Qibin Zhang, Da Meng, Giorgis Issac, Rui Zhao, Thomas L Fillmore, Rosey K Chu, et al. 2012. "JNK-Induced MCP-1 Production in Spinal Cord Astrocytes Contributes to Central Sensitization and Neuropathic Pain." *A Reversed-Phase Capillary Ultra-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (UPLC-MS) Method for Comprehensive Top-down/Bottom-up Lipid Profiling* 402 (9): 2923–33. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3623-08.2009>.JNK-induced.
- Gao, Yong-Jing, and Ru-Rong Ji. 2010. "Targeting Astrocyte Signaling for Chronic Pain." *October* 7 (4): 482–93. <https://doi.org/10.1016/j.nurt.2010.05.016>.Targeting.
- Gao, Yong Jing, Ling Zhang, and Ru Rong Ji. 2010. "Spinal Injection of TNF- α -Activated Astrocytes Produces Persistent Pain Symptom Mechanical Allodynia by Releasing Monocyte Chemoattractant Protein-1." *Glia* 58 (15): 1871–80. <https://doi.org/10.1002/glia.21056>.
- Garwood, C. J., L. E. Ratcliffe, J. E. Simpson, P. R. Heath, P. G. Ince, and S. B. Wharton. 2017. "Review: Astrocytes in Alzheimer's Disease and Other Age-Associated Dementias: A Supporting Player with a Central Role." *Neuropathology and Applied Neurobiology* 43 (4): 281–98. <https://doi.org/10.1111/nan.12338>.
- Gear, Robert. 1999. "Pain-Induced Analgesia Mediated by Mesolimbic Reward Circuits." *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 19 (16): 7175–81. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10436070>.
- . 2009. "Rostral Ventral Medulla Cholinergic Mechanism in Pain-Induced Analgesia." 154 (11): 2262–65. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2013.06.005>.Re-Thinking.
- Gerald W. Hart, Olof Lagerlof. 2011. "Cross Talk Between O-GlcNAcylation and Phosphorylation: Roles in Signaling, Transcription, and Chronic Disease," no. 2: 825–58. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060608-102511>.Cross.

- Gernot Riedel. 2003. "Glutamate Receptor Function in Learning and Memory Gernot." *Tetrahedron Letters* 38 (40): 6973–76. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(97\)01667-5](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(97)01667-5).
- Ghalandari-Shamami, Mohadeseh. 2011. "Intra-Accumbal NMDA but Not AMPA/Kainate Receptor Antagonist Attenuates WIN55,212-2 Cannabinoid Receptor Agonist-Induced Antinociception in the Basolateral Amygdala in a Rat Model of Acute Pain." *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 100 (2): 213–19. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2011.08.027>.
- Gry, Marcus, Rebecca Rimini, Sara Strömberg, Anna Asplund, Fredrik Pontén, Mathias Uhlén, and Peter Nilsson. 2009. "Correlations between RNA and Protein Expression Profiles in 23 Human Cell Lines." *BMC Genomics* 10: 1–14. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-365>.
- Guo W, Wang H, Watanabe M, Shimizu K, Zou S, LaGraize SC, Wei F, Dubner R, Ren K. 2012. "Glial-Cytokine-Neuronal Interactions Underlying the Mechanisms of Persistent Pain." *1* (3): 233–45. <https://doi.org/10.1016/j.dcn.2011.01.002>.The.
- Han, I, and J E Kudlow. 1997. "Reduced O Glycosylation of Sp1 Is Associated with Increased Proteasome Susceptibility." *Molecular and Cellular Biology* 17 (5): 2550–58. <https://doi.org/10.1128/MCB.17.5.2550>.
- Hart, Carmen-Rosa Torres & Gerald W. 1984. "Topography and Polypeptide Distribution of Terminal N-Acetylglucosamine Residues on the Surfaces of Intact Lymphocytes.Pdf," 3308–17.
- Hart, Gerald W., and and Jamey D. Marth. 2000. "The O-GlcNAc Transferase Gene Resides on the X Chromosome and Is Essential for Embryonic Stem Cell Viability and Mouse Ontogeny." *Send to Proc Natl Acad Sci U S A*. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0870.1986.tb00468.x>.
- Hecke, O. Van, Sophie K. Austin, Rafi A. Khan, B. H. Smith, and N. Torrance. 2014. "Neuropathic Pain in the General Population: A Systematic Review of Epidemiological Studies." *Pain* 155 (4): 654–62. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2013.11.013>.
- Helga E. de Vries. 2008. "Nrf2-Induced Antioxidant Protection: A Promising Target to Counteract ROS-Mediated Damage in Neurodegenerative Disease?" *Free Radical Biology and Medicine* 45 (10): 1375–83. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.09.001>.
- Hofstetter, Christoph P., Niklas A.V. Holmström, Johan A. Lilja, Petra Schweinhardt, Jinxia Hao, Christian Spenger, Zsuzsanna Wiesenfeld-Hallin, Shekar N. Kurpad, Jonas Frisén, and Lars Olson. 2005. "Allodynia Limits the Usefulness of Intraspinal Neural Stem Cell Grafts; Directed Differentiation Improves Outcome." *Nature Neuroscience* 8 (3): 346–53. <https://doi.org/10.1038/nn1405>.
- Hu, Yong, Lacinda Riesland, Andrew J. Paterson, and Jeffrey E. Kudlow. 2004. "Phosphorylation of Mouse Glutamine-Fructose-6-Phosphate Amidotransferase 2 (GFAT2) by CAMP-Dependent Protein Kinase Increases the Enzyme Activity." *Journal of Biological Chemistry* 279 (29): 29988–93. <https://doi.org/10.1074/jbc.M401547200>.
- Hunt, Stephen P, and Patrick W Mantyh. 2001. "The Molecular Dynamics Of."

- Neuroscience* 2 (February). <https://doi.org/10.1038/35053509>.
- Hurtado-Guerrero, Ramon, Helge C. Dorfmüller, and Daan M. van Aalten. 2008. "Molecular Mechanisms of O-GlcNAcylation." *Current Opinion in Structural Biology* 18 (5): 551–57. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2008.09.005>.
- J, Christopher, and Susan M Carlton. 1994. "GFAP Expression in Lumbar Spinal Cord of Naive and Neuropathic Rats Treated with MK-801." <http://www.sciencedirect.com/elib.tcd.ie/science/article/pii/S0014488684711654>.
- Ji, Ru Rong, Yasuhiko Kawasaki, Zhi Ye Zhuang, Yeong Ray Wen, and Isabelle Decosterd. 2006. "Possible Role of Spinal Astrocytes in Maintaining Chronic Pain Sensitization: Review of Current Evidence with Focus on BDNF/JNK Pathway." *Neuron Glia Biology* 2 (4): 259–69. <https://doi.org/10.1017/S1740925X07000403>.
- Johannes, Catherine B., T. Kim Le, Xiaolei Zhou, Joseph A. Johnston, and Robert H. Dworkin. 2010. "The Prevalence of Chronic Pain in United States Adults: Results of an Internet-Based Survey." *Journal of Pain* 11 (11): 1230–39. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2010.07.002>.
- Kacem, Kamel, Pierre Lacombe, Jacques Seylaz, and Gilles Bonvento. 1998. "Structural Organization of the Perivascular Astrocyte Endfeet and Their Relationship with the Endothelial Glucose Transporter: A Confocal Microscopy Study." *Glia*. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1136\(199805\)23:1<1::AID-GLIA1>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1136(199805)23:1<1::AID-GLIA1>3.0.CO;2-B).
- Karababa, Ayşe, Boris Görg, Freimut Schliess, and Dieter Häussinger. 2014. "O-GlcNAcylation as a Novel Ammonia-Induced Posttranslational Protein Modification in Cultured Rat Astrocytes." *Metabolic Brain Disease* 29 (4): 975–82. <https://doi.org/10.1007/s11011-013-9454-7>.
- Kawasaki, Yasuhiko, Zhen-zhong Xu, Xiaoying Wang, Jong-yeon Park, Ping-heng Tan, Yong-jing Gao, Kristine Roy, Gabriel Corfas, Eng H Lo, and Ru-rong Ji. 2008. "Spinal Injection of TNF- α -Activated Astrocytes Produces Persistent Pain Symptom Mechanical Allodynia by Releasing Monocyte Chemoattractant Protein-1" 14 (3): 331–36.
- Kazuhide, Inoue, and Tsuda Makoto. 2009. "Microglia and Neuropathic Pain." *Glia* 57 (14): 1469–79. <https://doi.org/10.1002/glia.20871>.
- Kida, Satoshi. 2002. "CREB Required for the Stability of New and Reactivated Fear Memories." *Nature Neuroscience* 5 (4): 348–55. <https://doi.org/10.1038/nn819>.
- Komirishetty, Prashanth. 2017. "Combination Strategy of PARP Inhibitor with Antioxidant Prevent Bioenergetic Deficits and Inflammatory Changes in CCI-Induced Neuropathy." *Neuropharmacology* 113: 137–47. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.09.027>.
- Linda M. 1990. "Excitatory Amino Acid Receptors and Nociceptive Neurotransmission in Rat Spinal Cord." *Pain* 41 (3): 309–21. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(90\)90008-2](https://doi.org/10.1016/0304-3959(90)90008-2).
- Linda M. 1987. "Nociceptive Action of Excitatory Amino Acids in the Mouse: Effects of Spinally Administered Opioids, Phencyclidine and Sigma Agonists." *J Pharmacol Exper Ther* 243 (1): 9–19.

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2822907>.
- Lonze, Bonnie E. 2002. "Apoptosis, Axonal Growth Defects, and Degeneration of Peripheral Neurons in Mice Lacking CREB." *Neuron* 34 (3): 371–85. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)00686-4](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)00686-4).
- M., Attal, Harousseau J.-L., Leyvraz S., Doyen C., Hulin C., Benboubker L., Agha I.Y., et al. 2006. "Maintenance Therapy with Thalidomide Improves Survival in Patients with Multiple Myeloma." *Blood* 108 (10): 3289–94. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-05-022962>.
- M.a., Junfeng, and Gerald W. Hart. 2013. "Protein O-GlcNAcylation in Diabetes and Diabetic Complications." *Expert Review of Proteomics* 10 (4): 365–80. <https://doi.org/10.1586/14789450.2013.820536>.
- M, Tsuda. 2003. "P2X4 Receptors Induced in Spinal Microglia Gate Tactile Allodynia after Nerve Injury." *Clinical Nuclear Medicine* 22 (9): 591–92. <https://doi.org/10.1097/00003072-199709000-00002>.
- Mao, Xingxing, Dongmei Zhang, Tao Tao, Xiaojuan Liu, Xiaolei Sun, Youhua Wang, and Aiguo Shen. 2015. "O-GlcNAc Glycosylation of P27kip1 promotes Astrocyte Migration and Functional Recovery after Spinal Cord Contusion." *Experimental Cell Research* 339 (2): 197–205. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2015.11.007>.
- Marchand, Fabien, Mauro Perretti, and Stephen B. McMahon. 2005. "Role of the Immune System in Chronic Pain." *Nature Reviews Neuroscience* 6 (7): 521–32. <https://doi.org/10.1038/nrn1700>.
- Merskey, H, and N Bogduk. 1994. *Classification of Chronic Pain. IASP Pain Terminology*. <https://doi.org/10.1002/ana.20394>.
- Mika, Joanna, Magdalena Zychowska, Katarzyna Popiolek-Barczyk, Ewelina Rojewska, and Barbara Przewlocka. 2013. "Importance of Glial Activation in Neuropathic Pain." *European Journal of Pharmacology* 716 (1–3): 106–19. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.01.072>.
- Morales-Alcelay, Susana. 2005. "AMPA Glutamate Receptors and Neuropathic Pain." *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* 3 (7): 757–63. <https://doi.org/10.2174/1389557033487719>.
- Moulin, D. De, A. Boulanger, A. J. Clark, H. Clarke, T. Dao, G. A. Finley, A. Furlan, et al. 2014. "Pharmacological Management of Chronic Neuropathic Pain: Revised Consensus Statement from the Canadian Pain Society." *Pain Research and Management* 19 (6): 328–35. <https://doi.org/10.1155/2014/754693>.
- Nelson, Eric E, and Amanda E Guyer. 2012. "Predominant Enhancement of Glucose Uptake in Astrocytes versus Neurons during Activation of the Somatosensory Cortex" 1 (3): 233–45. <https://doi.org/10.1016/j.dcn.2011.01.002>.The.
- O'Donnell, Niall, Natasha E Zachara, Gerald W Hart, and Jamey D Marth. 2004. "Protein Glycosylation Is a Requisite Modification in Somatic Cell Function and Embryo Viability Ogt -Dependent X-Chromosome-Linked Protein Glycosylation Is a Requisite Modification in Somatic Cell Function and Embryo Viability." *Mol Cell Biol* 24 (4): 1680–90. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.4.1680>.
- Ohayon, Maurice M., and Julia C. Stingl. 2012. "Prevalence and Comorbidity of

- Chronic Pain in the German General Population.” *Journal of Psychiatric Research* 46 (4): 444–50. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2012.01.001>.
- Oki, Tohru, Kazuto Yamazaki, Junro Kuromitsu, Masayuki Okada, and Isao Tanaka. 1999. “CDNA Cloning and Mapping of a Novel Subtype of Glutamine:Fructose-6-Phosphate Amidotransferase (GFAT2) in Human and Mouse.” *Genomics* 57 (2): 227–34. <https://doi.org/10.1006/geno.1999.5785>.
- Olivier-Van Stichelen, Stephanie, Peng Wang, Marcy Comly, Dona C. Love, and John A. Hanover. 2017. “Nutrient-Driven O-Linked N-Acetylglucosamine (O-GlcNAc) Cycling Impacts Neurodevelopmental Timing and Metabolism.” *Journal of Biological Chemistry* 292 (15): 6076–85. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.774042>.
- Paula Santoyo-Ramos, María Cristina Castañeda-Patlán and Martha Robles-Flores. 2018. “The Role of O-Linked-N-Acetylglucosamine (GlcNAc) Modification in Cell Signaling.” *Intech Open* 2: 64. <https://doi.org/10.5772/32009>.
- Peterson, Sherket B., and Gerald W. Hart. 2016. “New Insights: A Role for O-GlcNAcylation in Diabetic Complications.” *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 51 (3): 150–61. <https://doi.org/10.3109/10409238.2015.1135102>.
- Prebil, Mateja, Nina Vardjan, Jørgen Jensen, Robert Zorec, and Marko Kreft. 2011. “Dynamic Monitoring of Cytosolic Glucose in Single Astrocytes.” *Glia* 59 (6): 903–13. <https://doi.org/10.1002/glia.21161>.
- Quirion, Weiya Ma;Remi. 2002. “Partial Sciatic Nerve Ligation Induces Increase in the Phosphorylation of Extracellular Signal-Regulated Kinase (ERK) and c-Jun N-Terminal Kinase (JNK) in Astrocytes in the Lumbar Spinal Dorsal Horn and the Gracile Nucleus.”
- Ren, Ke. 2009. “Neuron-Glia Crosstalk Gets Serious: Role in Pain Hypersensitivity.” *Current Opinion in Anaesthesiology* 21 (5): 570–79. <https://doi.org/10.1097/ACO.0b013e32830eddbf.Neuron-glia>.
- Rexach, Jessica E, Peter M Clark, Daniel E Mason, Rachael L Neve, Eric C Peters, and Linda C Hsieh-Wilson. 2012. “Dynamic O-GlcNAc Modification Regulates CREB-Mediated Gene Expression and Memory Formation.” *Nature Chemical Biology* 8 (3): 253–61. <https://doi.org/10.1038/nchembio.770>.
- Robert Myers. 2006. “The Role of Neuroinflammation in Neuropathic Pain: Mechanisms and Therapeutic Targets.” *Drug Discovery Today* 11 (1–2): 8–20. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(05\)03637-8](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(05)03637-8).
- Sakamoto. 2011. “CREB: A Multifaceted Regulator of Neuronal Plasticity and Protection.” *Journal of Neurochemistry* 116 (1): 1–9. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.07080.x>.
- Scholz, J, and C J Woolf. 2002. “Can We Conquer Pain?” *Nat Neurosci* 5 Suppl (november): 1062–67. <https://doi.org/10.1038/nn942>.
- . 2007. “The Neuropathic Pain Triad: Neurons, Immune Cells and Glia.” *Nat Neurosci* 10 (11): 1361–68. <https://doi.org/10.1038/nn1992>.
- Shan Li. 2018. “Role of Keap1-Nrf2 Signaling in Anhedonia Symptoms in a Rat Model

- of Chronic Neuropathic Pain: Improvement With Sulforaphane.” *Frontiers in Pharmacology* 9 (August): 1–12. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00887>.
- Sorge, Stacie K. Totsch ;Robert E. 2017. “Immune System Involvement in Specific Pain Conditions Stacie.”
- Steen, Philippe Van Den, Pauline M. Rudd, Raymond A. Dwek, Ghislain Opdenakker, S. Marshall, V. Bacote, R. R. Traxinger, et al. 2014. “Extracellular O-Linked β -N-Acetylglucosamine: Its Biology and Relationship to Human Disease.” *Journal of Biological Chemistry* 33 (2): 1–7. <https://doi.org/10.4331/wjbc.v5.i2.224>.
- Su, Cathy, and Thomas L. Schwarz. 2017. “O -GlcNAc Transferase Is Essential for Sensory Neuron Survival and Maintenance.” *The Journal of Neuroscience* 37 (8): 2125–36. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3384-16.2017>.
- Sun, Chao, Jin Shang, Yuan Yao, Xiaohong Yin, Minghan Liu, Huan Liu, and Yue Zhou. 2016. “O-GlcNAcylation: A Bridge between Glucose and Cell Differentiation.” *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 20 (5): 769–81. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12807>.
- Suter, Wen, Decosterd. 2002. “Do Glia Control Pain?” *Neuron Glia Biol* 3 (3): 255–68.
- Tai, Hwan-ching, Hsieh-wilson, Linda C. 2004. “Parallel Identification of O-GlcNAc-Modified Proteins from Cell Lysates,” no. V: 10500–501.
- Tallent, Melanie K., Neal Varghis, Yuliya Skorobogatko, Lisa Hernandez-Cuebas, Kelly Whelan, David J. Vocadlo, and Keith Vosseller. 2009. “In Vivo Modulation of O-GlcNAc Levels Regulates Hippocampal Synaptic Plasticity through Interplay with Phosphorylation.” *Journal of Biological Chemistry* 284 (1): 174–81. <https://doi.org/10.1074/jbc.M807431200>.
- Taylor, Erica W, Kai Wang, Amy R Nelson, Teruko M Bredemann, Kyle B Fraser, Sarah M Clinton, Rosemary Puckett, Richard B Marchase, John C Chatham, and Lori L McMahon. 2014. “O-GlcNAcylation of AMPA Receptor GluA2 Is Associated with a Novel Form of Long-Term Depression at Hippocampal Synapses.” *The Journal of Neuroscience* 34 (1): 10–21. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4761-12.2014>.
- Tong, Chi-kun, and Amy B Macdermott. 2014. “Synaptic GluN2A and GluN2B Containing NMDA Receptors within the Superficial Dorsal Horn Activated Following Primary Afferent Stimulation” 34 (33): 10808–20. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0145-14.2014>.
- Torrance, Nicola, Blair H. Smith, Michael I. Bennett, and Amanda J. Lee. 2006. “The Epidemiology of Chronic Pain of Predominantly Neuropathic Origin. Results From a General Population Survey.” *Journal of Pain* 7 (4): 281–89. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2005.11.008>.
- Trang, Tuan, Simon Beggs, and Michael W. Salter. 2006. “Purinoreceptors in Microglia and Neuropathic Pain.” *Pflugers Archiv European Journal of Physiology* 452 (5): 645–52. <https://doi.org/10.1007/s00424-006-0074-5>.
- Trinidad, Jonathan C., David T. Barkan, Brittany F. Gullledge, Agnes Thalhammer, Andrej Sali, Ralf Schoepfer, and Alma L. Burlingame. 2012. “Global Identification and Characterization of Both O-GlcNAcylation and Phosphorylation at the Murine

- Synapse.” *Molecular & Cellular Proteomics* 11 (8): 215–29.
<https://doi.org/10.1074/mcp.O112.018366>.
- Tsuda, Makoto, Kazuhide Inoue, and Michael W. Salter. 2005. “Neuropathic Pain and Spinal Microglia: A Big Problem from Molecules in ‘small’ Glia.” *Trends in Neurosciences* 28 (2): 101–7. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2004.12.002>.
- Vosseller, Keith. 2006. “O -Linked N -Acetylglucosamine Proteomics of Postsynaptic Density Preparations Using Lectin Weak Affinity Chromatography and Mass Spectrometry.” *Molecular & Cellular Proteomics* 5 (5): 923–34.
<https://doi.org/10.1074/mcp.T500040-MCP200>.
- Wani, Willayat Y., Xiaosen Ouyang, Gloria A. Benavides, Matthew Redmann, Stacey S. Cofield, John J. Shacka, John C. Chatham, Victor Darley-USmar, and Jianhua Zhang. 2017. “O-GlcNAc Regulation of Autophagy and α -Synuclein Homeostasis; Implications for Parkinson’s Disease.” *Molecular Brain* 10 (1): 14–17.
<https://doi.org/10.1186/s13041-017-0311-1>.
- Watkins, Linda R., Erin D. Milligan, and Steven F. Maier. 2001. “Glial Activation: A Driving Force for Pathological Pain.” *Trends in Neurosciences* 24 (8): 450–55.
[https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(00\)01854-3](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(00)01854-3).
- Waxman, Stephen G. 1999. “The Molecular Pathophysiology of Pain: Abnormal Expression of Sodium Channel Genes and Its Contributions to Hyperexcitability of Primary Sensory Neurons.” *Pain* 82 (SUPPL.1). [https://doi.org/10.1016/S0304-3959\(99\)00147-5](https://doi.org/10.1016/S0304-3959(99)00147-5).
- Weber, Bruno, and L. Felipe Barros. 2015. “The Astrocyte: Powerhouse and Recycling Center.” *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 7 (12): 1–15.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020396>.
- Wieseler-Frank, Julie. 2004. “Glial Activation and Pathological Pain.” *Neurochemistry International* 45 (2–3): 389–95. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2003.09.009>.
- Wilcox, Teresa, and Amy Hirshkowitz. 2015. “NBCe1 Mediates the Acute Stimulation of Astrocytic Glycolysis by Extracellular K⁺” 85 (0 1): 1–27.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2013.08.045>.The.
- Willayat Y Wani, and Jianhua Zhang. 2017. “O-GlcNAcylation and Neurodegeneration,” 80–87. <https://doi.org/10.1186/s40945-017-0033-9>.Using.
- Xu, Duo. 2016. “HHS Public Access” 25 (3): 289–313. <https://doi.org/10.1007/s11065-015-9294-9>.Functional.
- Yang, Yong Ryoul, Minseok Song, Ho Lee, Yoon Jeon, Eun Jeong Choi, Hyun Jun Jang, Hyo Youl Moon, et al. 2012. “O-GlcNAcase Is Essential for Embryonic Development and Maintenance of Genomic Stability.” *Aging Cell* 11 (3): 439–48.
<https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2012.00801.x>.
- Zhu, Yanping, Xiaoyang Shan, Scott A. Yuzwa, and David J. Vocadlo. 2014. “The Emerging Link between O-GlcNAc and Alzheimer Disease.” *Journal of Biological Chemistry* 289 (50): 34472–81. <https://doi.org/10.1074/jbc.R114.601351>.