

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E
APLICADA

RAFAELA MANO GUIMARÃES

Investigação de enzimas metabólicas em células gliais e sua
implicação no desenvolvimento de doenças neuroinflamatórias

RIBEIRÃO PRETO - SP

2023

RAFAELA MANO GUIMARÃES

Investigação de enzimas metabólicas em células gliais e sua
implicação no desenvolvimento de doenças neuroinflamatórias

Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de Concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Orientador: Prof. Dr. Thiago Mattar Cunha

RIBEIRÃO PRETO - SP

2023

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

Ficha Catalográfica

Guimarães, Rafaela Mano

Investigação de enzimas metabólicas em células gliais e sua implicação no desenvolvimento de doenças neuroinflamatórias. Ribeirão Preto, 2023. 62 p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Orientador: Prof. Dr. Thiago Mattar Cunha

1.Astrócitos. 2.Neuroinflamação. 3.Metabolismo

Nome: Rafaela Mano Guimarães

Título: Investigação de enzimas metabólicas em células gliais e sua implicação no desenvolvimento de doenças neuroinflamatórias.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de Concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Aprovado (a) em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. Thiago Mattar Cunha. Instituição: FMRP - USP.

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Assinatura:

Prof (a). Dr (a).:

Instituição:

Assinatura:

Prof (a). Dr(a).:

Instituição:

Assinatura:

Prof (a). Dr(a).:

Instituição:

Assinatura:

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

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, José Roberto e Rose Nadia, os quais me deram a vida e me ensinaram a vivê-la dignamente. Obrigada por todo apoio, pelos valiosos conselhos e por torcerem incondicionalmente pelo meu sucesso. À minha irmã Beatriz, por todo carinho, paciência e por sempre acreditar em minha capacidade. Amo vocês!

À toda minha família e aos meus velhos amigos, que mesmo distante, me deram suporte, aconchego e sempre demonstram companheirismo, vocês me dão força para superar os obstáculos!

Ao Prof. Dr. Thiago Mattar Cunha, por permitir que fizesse parte do seu grupo de pesquisa, pelos momentos de ensinamentos e discussões científicas, pelo constante incentivo, apoio e pelo exemplo de dedicação. Serei eternamente grata a tudo que o você me proporcionou!

Aos professores Dr. José Carlos Alves-Filho, Dr. Fernando Cunha e Dr. Marco Colonna pelas discussões científicas e colaboração com nosso grupo de pesquisa, fundamental para o desenvolvimento do presente trabalho.

Aos meus colaboradores de trabalho: Larissa Pinto, Beatriz Adjafre, Isadora Marques, Conceição Elidianne Aníbal e Gabriel Victor. Obrigada pela paciência, disposição, ensinamentos e dedicação às longas horas de experimento!

A todos os demais alunos do grupo da “Dor”: Isaac, Maria Cláudia, Atlante, Felipe, Glauce e Samara, pelas discussões científicas e por manterem um clima agradável de trabalho.

Aos demais amigos do LID, em especial: Bruno Marcel, Eduardo Damasceno, Guilherme Cebinelli, Bruna Manuela, Paulo Henrique e Marcos. Obrigada por esses anos de convivência e aprendizado. Obrigada por terem me ajudado sempre que necessário e tornado minha jornada dentro do laboratório mais leve, proveitosa e divertida.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica e Imunologia, do Departamento de Farmacologia e Departamento de Biologia Celular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, em especial: Katinha, Ieda, Marcela e Roberta.

Aos amigos do laboratório do Prof. Marco Colonna: José Fachi, Cristiane Sécca, Darya, Alina, Tihanna, Patrick, Yingyue e Zhangying.

A amiga e secretária do nosso Programa de Pós-Graduação, Ana Cristine, por toda sua dedicação e disponibilidade em sempre nos ajudar ao longo desse período.

Aos professores presentes na Banca Examinadora, pela disponibilidade em contribuir para a avaliação desse trabalho e do meu desenvolvimento profissional e científico.

Às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPESP por todo o apoio financeiro que tem dado a ciência Brasileira, em especial à FAPESP pelo financiamento das minhas bolsas de doutorado e doutorado-sanduíche.

Por fim, agradeço a todos os que foram envolvidos de maneira direta ou indireta para a realização desse trabalho!

RESUMO

Guimarães, R. M. **Investigação de enzimas metabólicas em células gliais e sua implicação no desenvolvimento de doenças neuroinflamatórias.** 2023. Tese de Doutorado - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil.

Os astrócitos são as células gliais mais abundantes do sistema nervoso central (SNC) e essenciais para a manutenção da homeostase cerebral. No entanto, em condições patológicas como as observadas no modelo experimental de esclerose múltipla (EAE), sugere-se que a sua ativação é deletéria por amplificar a resposta inflamatória local. Recentemente, tem sido demonstrado uma interessante correlação entre inflamação e a promoção de vias metabólicas alternativas, como a via das hexosaminas (HBP, do inglês *hexosamine biosynthesis pathway*). O produto final da HBP é o UDP-N-acetilglucosamina que, por ação da enzima O-GlicosilTransferase (OGT), gera modificações pós-traducionais denominadas O-GlcNAcilação. A ocorrência da O-GlcNAcilação tem sido associada com a ativação de células do sistema imunológico como macrófagos e linfócitos T, e com a progressão de certas doenças de cunho neurodegenerativo. Entretanto, a relação entre HBP e a O-GlcNAcilação em astrócitos permanece inexplorada no contexto da neuroinflamação. Através da utilização de estudos *in vitro* e *in vivo*, citometria de fluxo, análises transcricionais de larga escala, técnicas de imagem e quantificações de proteínas, o presente projeto teve como objetivo o melhor entendimento desses mecanismos. Após o estabelecimento de culturas primárias de astrócitos obtidos de camundongos neonatos, caracterizamos um método alternativo para o estudo dessas células em um sistema isolado. Sob estímulo de moléculas que mimetizam alguns aspectos da neuroinflamação (TNF, IL-1 α e C1q) observamos uma significativa indução de IL-6, CCL2, CXCL1 e CXCL10. Nestas condições, a análise da expressão de enzimas cruciais da via das HBP demonstrou uma correlação positiva com a indução dos transcritos da *Ogt*, *Oga*, *Gfpt1/2*. Uma série de experimentos funcionais utilizando inibidores farmacológicos dessas enzimas revelou que o bloqueio da OGA (O-GliconAcase - catalisa a remoção do grupamento UDP-N-acetilglucosamina), via Thiamet G, impactou negativamente na promoção de IL-6 e CXCL1 frente a estímulos inflamatórios. Com o objetivo de explorar esses mecanismos *in vivo*, geramos animais *Aldh1l1^{CreER}/Ogt^{flox/flox}* nos quais a OGT pode ser geneticamente depletada em astrócitos pelo uso de tamoxifeno. Após a validação satisfatória dessa estratégia experimental, submetemos esses animais ao modelo de EAE e investigamos o papel funcional da OGT nos parâmetros clínicos da doença. Na ausência da OGT em astrócitos observou-se uma melhora significativa no desenvolvimento da doença, sugerindo um papel deletério da HBP na neuroinflamação. Por citometria de fluxo, observamos uma correlação significativa entre a deficiência de OGT e um menor infiltrado de células imunes no SNC desses animais. Tanto a proporção quanto o número absoluto de leucócitos, micróglia, linfócitos T (CD4⁺, Treg, Th17), macrófagos e células dendríticas foram afetados na ausência da OGT. Esses resultados sugerem que a expressão de OGT e, virtualmente, a O-GlcNAcilação de proteínas é responsável pela comunicação dos astrócitos com células imunes que infiltram o CNS de animais com EAE. O não envolvimento da OGT na produção de todos os mediadores inflamatórios em cultura, sugere um efeito independente de citocinas e quimiocinas classicamente descritas no EAE. Estudos posteriores investigando esses mecanismos em mais detalhes encontram-se em andamento no nosso grupo de pesquisa e poderão identificar potenciais alvos para o tratamento de doenças que acometem o SNC.

ABSTRACT

Astrocytes are the most abundant glial cells in the central nervous system (CNS) and essential for maintaining brain homeostasis. However, in pathological conditions such as those observed in the experimental model of multiple sclerosis (EAE), it is suggested that its activation is deleterious as it amplifies the local inflammatory response. Recently, an interesting correlation has been demonstrated between inflammation and the promotion of alternative metabolic pathways, such as the hexosamine biosynthesis pathway (HBP). The final product of HBP is UDP-N-acetylglucosamine which, by the action of the enzyme O-GlycosylTransferase (OGT), generates post-translational modifications called O-GlcNAcylation. The occurrence of O-GlcNAcylation has been associated with the activation of immune system cells such as macrophages and T lymphocytes, and with the progression of certain neurodegenerative diseases. However, the relationship between BPH and O-GlcNAcylation in astrocytes remains unexplored in the context of neuroinflammation. Through the use of in vitro and in vivo studies, flow cytometry, large-scale transcriptional analyses, imaging techniques and protein quantification, this project aimed to better understand these mechanisms. After establishing primary cultures of astrocytes obtained from newborn mice, we characterize an alternative method for studying these cells in an isolated system. Under stimulus of molecules that mimic some aspects of neuroinflammation (TNF, IL-1 α and C1q) we observed a significant induction of IL-6, CCL2, CXCL1 and CXCL10. Under these conditions, analysis of the expression of crucial enzymes in the BPH pathway showed a positive correlation with the induction of *Ogt*, *Oga*, *Gfpt1/2* transcripts. A series of functional experiments using pharmacological inhibitors of these enzymes revealed that the blockade of OGA (O-Glucosyltransferase - catalyzes the removal of the UDP-N-acetylglucosamine group), via Thiamet G, negatively impacted the promotion of IL-6 and CXCL1 against stimuli inflammatory. In order to explore these mechanisms in vivo, we generated *Aldh1l1CreER/Ogtflox/flox* animals in which OGT can be genetically depleted in astrocytes by the use of tamoxifen. After the satisfactory validation of this experimental strategy, we submitted these animals to the EAE model and investigated the functional role of OGT in the clinical parameters of the disease. In the absence of OGT in astrocytes, a significant improvement in disease development was observed, suggesting a deleterious role for BPH in neuroinflammation. By flow cytometry, we observed a significant correlation between OGT deficiency and a lower infiltration of immune cells in the CNS of these animals. Both the proportion and the absolute number of leukocytes, microglia, T lymphocytes (CD4⁺, Treg, Th17), macrophages and dendritic cells were affected in the absence of OGT. These results suggest that OGT expression and, virtually, O-GlcNAcylation of proteins is responsible for the communication of astrocytes with immune cells that infiltrate the CNS of animals with EAE. The non-involvement of OGT in the production of all inflammatory mediators in culture suggests an independent effect of cytokines and chemokines classically described in EAE. Further studies investigating these mechanisms in more detail are underway in our research group and may identify potential targets for the treatment of diseases that affect the CNS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Purificação da cultura primária de astrócitos.....	27
Figura 2. A ativação de astrócitos por TNF induz a expressão e produção de mediadores inflamatórios.....	28
Figura 3. A ativação de astrócitos por TNF induz produção de mediadores inflamatórios de maneira dose-dependente.....	29
Figura 4. A ativação de astrócitos por LPS também induz produção de mediadores inflamatórios.....	30
Figura 5. A ativação de astrócitos por TNF, IL-1 α e C1q induz maior produção de mediadores inflamatórios em comparação ao TNF.....	31
Figura 6. A ativação dos astrócitos por TNF, IL-1 α e C1q altera a expressão de enzimas responsáveis pela regulação do metabolismo glicolítico.....	32
Figura 7. A ativação dos astrócitos por TNF, IL-1 α e C1q altera a expressão de enzimas da via glicolítica.....	33
Figura 8. Astrócitos pré-incubados em condições inflamatórias apresentam deficiência da capacidade glicolítica, com a respiração mitocondrial e captação da glicose preservadas.....	34
Figura 9. A ativação dos astrócitos por TNF induz expressão de enzimas da via das hexosaminas.....	35
Figura 10. A expressão de GFAT e OGT permanece inalterada frente a estímulos inflamatórios.....	35
Figura 11. A O-GlcNacilação global permanece inalterada em astrócitos primários estimulados com TNF.....	36
Figura 12. Validação experimental dos inibidores farmacológicos da O-GlcNacilação em cultura de astrócitos.....	37
Figura 13. A inibição da OGA altera a produção de citocinas inflamatórias nos astrócitos.....	37
Figura 14. Redução da dimensão utilizando tSNE de células do sistema nervoso central de animais C57BL/6 naives.....	39
Figura 15. Expressão média basal das enzimas da via das Hexosaminas entre as diferentes populações celulares do SNC de animais naives.....	52
Figura 16. A expressão da OGT é maior em astrócitos do que em micrógliia sob condições homeostáticas.....	40
Figura 17. Diferentes populações celulares compõe o SNC de animais induzidos com EAE.....	40
Figura 18. A expressão da enzima OGT se altera entre as subpopulações de astrócitos durante o curso do EAE.....	41
Figura 19. O tratamento com tamoxifeno induz recombinação da enzima <i>Cre recombinase</i> em astrócitos da medula espinhal.....	42
Figura 20. A expressão da OGT é virtualmente ausente em astrócitos da medula espinhal de animais <i>Aldh11^{creER}/Ogt^{fl/fl}</i> tratados com tamoxifeno.....	43
Figura 21. A expressão da OGT nos astrócitos promove o desenvolvimento da EAE.....	44
Figura 22. A ausência da OGT em astrócitos altera o padrão de distribuição da mielina e dos astrócitos durante a EAE.....	45
Figura 23. A expressão da enzima <i>Cre recombinase</i> não altera o fenótipo da EAE.....	46
Figura 24. A melhora no score clínico não se correlaciona com a resposta imune periférica.....	47
Figura 25. A ausência da OGT em astrócitos não afeta a resposta antígeno-específica das células T durante o desenvolvimento da EAE.....	47
Figura 26. A melhora no score clínico se correlaciona com a redução na resposta inflamatória no SNC.....	48
Figura 27. A melhora no score clínico se correlaciona com uma redução na resposta imune central.....	49

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	5
1.1 Células da glia e astrócitos.....	5
1.2 Os astrócitos em homeostáticos.....	6
1.3 Os astrócitos reativos	7
1.4 Os astrócitos na esclerose múltipla.....	9
1.5 Metabolismo no SNC e nos astrócitos.....	12
1.6 A via das hexosaminas.....	13
1.7 A O-GlcNAcilação em células imunes.....	16
1.8 A O-GlcNAcilação no SNC: homeostase e na doença.....	17
1.9 A O-GlcNAcilação nos astrócitos.....	18
2. OBJETIVOS	20
2.1 Objetivo Geral	20
2.2 Objetivos Específicos	20
3. MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1 Experimentação animal	21
3.1.1 Depleção da enzima OGT em astrócitos	21
3.1.2 Indução do modelo experimental EAE.....	21
3.2 Análises de bioinformática	22
3.3 Cultura primária de astrócitos.....	22
3.4 Processamento de tecidos para citometria de fluxo.	22
3.5 Citometria de fluxo.	23
3.6 qPCR.....	24
3.7 ELISA.....	24
3.8 Western blotting.	25
3.9 Seahorse.....	25
3.10 Imunofluorescência	26
3.11 Análise estatística	26
4. RESULTADOS	27
4.1 Padronização da cultura primária de astrócitos e avaliação da resposta frente a estímulos inflamatórios.....	27
4.2 Os astrócitos cultivados sob condições inflamatórias diminuem a capacidade glicolítica	31
4.3 O papel da O-GlcNacilação na resposta inflamatória dos astrócitos <i>in vitro</i>	34
4.4 A avaliação da via das hexosaminas nos astrócitos <i>in vivo</i>	38
4.5 A avaliação da via das hexosaminas durante a neuroinflamação.	40
4.6 Investigação do papel da OGT nos astrócitos durante o desenvolvimento do EAE.	41
5. DISCUSSÃO	50
6. CONCLUSÃO.....	54
7. REFERÊNCIAS.....	55

1. INTRODUÇÃO

1.1 Células da glia e astrócitos

O sistema nervoso central (SNC) é constituído por subtipos de células neurais e não-neurais, comumente chamadas de células gliais. Oligodendrócitos, micróglia e astrócitos representam as principais populações gliais. Destes, os astrócitos compõem uma parte significativa das células residentes no cérebro e medula espinhal, em torno de 30% (1, 2).

As células da glia foram originalmente descritas em 1856 por Rudolf Ludwig Carl Virchow que as chamou de neuroglia, com alusão ao tecido conjuntivo que circundava os neurônios. Anos mais tarde, Camilo Golgi obteve as primeiras imagens precisas dessas células, que foram distinguidas pela ausência de axônios quando coradas com cromato de prata. Somente em 1893 o pesquisador húngaro Michael Von Lenhossék cunhou o termo “astrócitos”, referindo-se a um subtipo particular de célula glial em formato de estrela (*astron*).

Após a caracterização inicial, os astrócitos passaram a ser classificados em dois subtipos baseados em suas características morfológicas: os fibrosos, presentes na substância branca e os protoplasmáticos, residentes na substância cinzenta (3-5). Essa perspectiva histórica combinada aos avanços recentes na área da neurociência dão uma ideia da grande heterogeneidade e evidencia as complexas funções fisiopatológicas das populações astrocíticas no SNC.

Com o advento de novas ferramentas moleculares como linhagens transgênicas de animais utilizando o sistema *Cre-lox*, confecção de vetores virais, e as técnicas de proteômicas e de sequenciamento em larga escala, existe uma maior descrição das assinaturas moleculares, morfológicas e funcionais das diferentes subpopulações gliais. Neste sentido, ao menos cinco subtipos de astrócitos são espacialmente descritos no córtex e hipocampo de camundongos adultos saudáveis, com perfis transcricionais diretamente relacionados às funções de sinaptogênese, neurotransmissão, transporte de íons e água, formação e/ou manutenção da barreira hematoencefálica e regulação imunológica (6).

A diversidade dos astrócitos pode ser observada desde os eventos de especificação embrionária até o início do período pós-natal e depende diretamente do *crosstalk* com outros subtipos celulares, em especial, com os neurônios (7-9).

Em condições patológicas, os astrócitos são caracterizados por um perfil transcricional distinto e são comumente chamados de astrócitos reativos. Ao identificar sinais inflamatórios presentes no microambiente, por exemplo, os astrócitos podem promover ou controlar a inflamação. Logo, não é surpreendente o fato de que essas células tem sido frequentemente estudadas em diversas condições neuroinflamatórias, como as que ocorrem na doença de Alzheimer (10), de Parkinson (11) e na esclerose múltipla (12, 13).

1.2 Os astrócitos homeostáticos

Os astrócitos participam de diversos processos cruciais para a manutenção da homeostasia no SNC, como na reciclagem de neurotransmissores, regulação iônica, sinaptogênese, transmissão sináptica e (5) na formação da barreira hematoencefálica (BHE).

A BHE funciona como uma interface que isola o SNC da circulação sanguínea periférica e, assim, controla a troca de moléculas para dentro e fora do cérebro. Além das projeções terminais dos astrócitos (*endfeet*), a barreira hematoencefálica é composta por células endoteliais mantidas por junções de oclusão (*tight junctions*) e envolve os capilares com os pericitos e a lâmina basal (14, 15). Através da liberação de diversos fatores de crescimento como VEGF (do inglês *Vascular Endothelial Growth Factor*), GDNF (do inglês *Glial Cell line-Derived Neurotrophic Fator*), bFGF (do inglês *basic Fibroblast Growth Factor*) e angiopoetina-1, os astrócitos contribuem para a formação das junções de oclusão, promoção de sistemas enzimáticos e na polarização de transportadores (16, 17).

As extremidades perivasculares dos astrócitos são equipadas com canais especializados fundamentais para a regulação das concentrações iônicas, como a aquaporina 4 (AQP4) e o canal de potássio 4.1 (Kir4.1) (18-20). A regulação extracelular de potássio pelos astrócitos tem sido tópico de muitos estudos e está diretamente envolvida na excitabilidade neuronal (21)(22, 23).

Além das propriedades descritas anteriormente, os astrócitos emitem projeções peri-sinápticas e formam o chamado complexo “tripartite” com os terminais nervosos. Essa conformação é crucial para comunicação astrócitos-neurônios e ocorre por meio de canais iônicos e da sinalização via neurotransmissores e metabólitos (24-26). Neste complexo, destaca-se a reciclagem do glutamato, o principal neurotransmissor excitatório do SNC. Através da expressão dos transportadores GLAST/EAAT1 (do inglês

GLutamate ASpartate Transporter/Excitatory Amino Acid Transporter 1) e GLT-1/EAAT2 (do inglês *Glutamate Transporter-1/Excitatory Amino Acid Transporter 2*) os astrócitos são capazes de capturar o glutamato do meio (27). No interior destas células, o glutamato é convertido em glutamina e posteriormente transportado aos neurônios via GLT-1. Disfunções desses transportadores estão associadas ao desenvolvimento de doenças neurodegenerativas tendo-se em vista que a liberação excessiva de glutamato pode levar a morte neuronal por hiper-excitabilidade (28, 29).

A reciclagem dos neurotransmissores na sinapse tripartite também pode desencadear alterações osmóticas do meio. O transporte de glutamato, por exemplo, é dependente de Na^+ e gera maior efluxo de íons e água. O inchaço dos astrócitos decorrente da atividade neuronal contribui para a recuperação do equilíbrio iônico e do volume celular e também pode aumentar a concentração intracelular de Ca^{2+} (30). Ao mesmo tempo, esse pico transitório nos níveis de Ca^{2+} , desencadeia a liberação adicional de outros gliotransmissores pelos astrócitos (como o trifosfato de adenosina (ATP), o glutamato e a D-serina) oferecendo vias paralelas de regulação da atividade sináptica (31).

Além das interações com neurônios, os astrócitos se conectam entre si através de hemicanais e formam rotas de comunicação de junções intercelulares. Este *crosstalk* permite que ondas de cálcio se propaguem e contribui para a disseminação de moléculas de sinalização em longas distâncias (32).

A captação extracelular de K^+ , glutamato e as ondas intercelulares de Ca^{2+} desencadeiam a liberação de lactato, um importante intermediário da comunicação entre astrócitos e neurônios que forma o chamado acoplamento neurometabólico. Na sinapse tripartite, o lactato pode ser capturado pelos neurônios via transportadores de ácidos monocarboxílicos (MCTs) (33, 34) e posteriormente utilizado para suprir as necessidades energéticas. O acoplamento neurometabólico é fundamental para o correto funcionamento dos neurônios. A desregulação destas vias também tem sido frequentemente reportada em várias doenças de cunho neurodegenerativo (35)(36).

1.3 Os astrócitos reativos

Diversos processos patológicos que atingem o SNC, como trauma, infecções e doenças neurodegenerativas, estão associados à astrogliose, uma resposta marcada pelo remodelamento morfológico, molecular e funcional dos astrócitos. Os astrócitos reativos

são altamente heterogêneos e, portanto, podem promover o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, mas também o reparo do tecido (37).

Uma característica comum dos astrócitos reativos em diferentes espécies é a regulação positiva da proteína glial fibrilar ácida (GFAP). O aumento de GFAP, em nível transcricional e proteico, é observado na maioria das lesões que atingem o SNC, sendo amplamente utilizado como um marcador de reatividade (1). Entretanto, a expressão dessa proteína pode variar dependendo da sua localização no SNC, sua proximidade com o local da lesão e o tipo de lesão. Apesar de indicar a reatividade, esse marcador não informa a função ou a heterogeneidade subjacente (38).

Os astrócitos reativos são considerados componentes ativos na inflamação do SNC, uma vez que expressam uma ampla variedade de receptores, incluindo os de reconhecimento padrão e de citocinas. Assim, esse subtipo glial também responde por meio da produção de moléculas imunorreguladoras que podem promover ou limitar a inflamação em resposta aos insultos no microambiente do SNC. Estudos recentes mostram que a produção de neurotrofina-3 e o fator neurotrófico, promove a recuperação de lesões graves na medula espinhal, através da regeneração axonal (39, 40). Por outro lado, subtipos de astrócitos reativos liberam uma gama de mediadores pró-inflamatórios que podem favorecer o recrutamento de células imunes para o SNC. Entre estes, destacam-se a IL-6, quimiocinas como C-X-C ligante do motivo (CXCL)-1 e IL-8 (CXCL8), proteína 10 induzida por INF- γ (IP-10/CXCL10), fator de necrose tumoral (TNF), proteína quimioatraente de monócitos 1 (MCP-1/quimiocina C-C ligante do motivo (CCL2)), proteína inflamatória 1 alfa de macrófagos (MIP-1 α /CCL3), fator inibidor de migração de macrófagos (MIF), fatores estimuladores de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF) e fatores estimuladores de colônias de granulócitos (G-CSF) (41-44).

A produção desses mediadores pode ser desencadeada por citocinas e fatores de crescimento, como interleucina IL-1 α , IL-6, TNF, interferon (IFN)- γ , fator inibidor de leucemia (LIF), fator neurotrófico ciliar e fator de crescimento de fibroblastos (FGF)-2, FGF-8 (45-50). Além disso, a proteína A β , mediadores da imunidade inata, como lipopolissacarídeo (LPS), purinas, como ATP, neurotransmissores, como noradrenalina e glutamato, e moléculas de estresse oxidativo, como espécies reativas de oxigênio (ROS), também tem o potencial de regular a astrogliose (51-55). Esses mediadores podem ser liberados em resposta a diferentes formas de insultos ao SNC por diferentes células, como

os oligodendrócitos, neurônios, micróglia, leucócitos infiltrantes, células endoteliais, pericitos e até por outros astrócitos (55).

A resposta gerada pelos astrócitos é modulada por diferentes vias de sinalização e fatores de transcrição, incluindo STAT3, NFAT e NF- κ B. A via NF- κ B está fortemente associada à neuroinflamação e doenças neurodegenerativas. Nos astrócitos, o fator de transcrição NF- κ B pode ser ativado por mediadores pró-inflamatórios, como citocinas (TNF, IL-1 β e IL-17), espécies reativas de oxigênio (ROS) e agonistas dos receptores do tipo Toll (TLR) (56). A regulação negativa de NF- κ B nos astrócitos tem sido associada à diminuição da inflamação ou lesão do SNC em diferentes contextos, como nos modelos de encefalomielite autoimune experimental (EAE) e de lesão da medula espinhal (57, 58).

Com base na expressão de um conjunto de genes, dois estados de ativação para os astrócitos murinos reativos têm sido descritos, denominados A1 e A2. O fenótipo A1 é induzido por TNF, IL-1 α e pelo componente do complemento 1q (C1q). Em contraste com os astrócitos reativos A2, que são induzidos por isquemia e promovem a sobrevivência neuronal e o reparo tecidual, foi demonstrado *in vitro* que os astrócitos A1 perdem várias das suas funções características, como a capacidade de promover a sobrevivência e o crescimento neuronal, a formação funcional das sinapses e a poda sináptica via fagocitose.

O componente 3 do complemento (C3) foi o gene mais altamente regulado nos astrócitos A1, sendo detectado em amostras de cérebro de pacientes com doença de Alzheimer, Parkinson e esclerose múltipla (EM), o que sugere a participação dos astrócitos A1 na patogênese de doenças neurológicas. Apesar desses achados terem sido amplamente utilizados como referência para trabalhos posteriores, ainda não está claro se a identificação desses subconjuntos de astrócitos reativos associados à doença são estáveis ou apresentam algum grau de plasticidade (59).

1.4 Os astrócitos na esclerose múltipla

A esclerose múltipla (EM) é uma doença neurológica inflamatória crônica desencadeada por fatores genéticos e ambientais, caracterizada por uma resposta autoimune à mielina. No mundo, a doença atinge cerca de 2,8 milhões de pessoas, enquanto no Brasil, segundo o Comitê Brasileiro de Tratamento e Pesquisa em Esclerose Múltipla, aproximadamente 40.000 indivíduos convivem com essa patologia, enfrentando uma variedade de deficiências físicas e cognitivas. O diagnóstico da doença costuma

acontecer entre os 20 e 50 anos de idade, sendo a prevalência em mulheres de três a quatro vezes maior do que em homens (60).

O curso clínico da EM apresenta várias fases e a doença pode ser classificada em subtipos: remitente-recorrente, progressiva primária e progressiva secundária (61). A EM remitente-recorrente (EMRR) é a forma mais comum, representando mais de 80% dos casos e é definida por episódios de sintomas novos ou agravados seguidos por períodos de recuperação. Por mecanismos que permanecem desconhecidos, em torno de 5% dos pacientes com EMRR podem evoluir para EM progressiva secundária (SPMS), a forma mais rara da doença. A SPMS é caracterizada pelo acúmulo progressivo e irreversível da incapacidade neurológica, sem aparente remissão e com resposta limitada à terapias. Os tratamentos disponíveis para a EM atuam, principalmente, na modulação do sistema imunológico. Apesar dos avanços recentes, ainda apresentam eficácia limitada e alguns estão associados a efeitos colaterais graves (62).

A etiologia da EM permanece pouco compreendida, mas algumas evidências sugerem que esteja relacionada à fatores genéticos e ambientais. Nesse sentido, variações alélicas do haplótipo HLA-DR2 (Human Leukocyte Antigen DR2) têm sido descritas em pacientes com MS. Os fatores ambientais que favorecem a EM incluem baixos níveis de vitamina D, tabagismo e infecção pelo vírus Epstein-Barr (63).

Os estudos sobre a patogênese e tratamento para a EM são extensivamente realizados em modelos pré-clínicos, majoritariamente no modelo de EAE. Esse modelo compartilha características patológicas comuns com a EM, como a neuroinflamação, ativação de células gliais, perda axonal e desmielinização. O desenvolvimento do EAE pode variar em diferentes linhagens animais. Em camundongos C57BL/6, a imunização com o peptídeo MOG em CFA induz uma forma crônica monofásica do EAE. Nesse caso, os sinais clínicos da doença são didaticamente divididos em três fases: inicial ou *priming*, que ocorre por volta de 9 a 13 dias, caracterizada pelo aparecimento dos déficits motores, aguda ou *peak*, por volta de 15 a 20 dias e a fase crônica ou *remission*, com a redução do score clínico (64, 65).

Mecanicamente, a inflamação desencadeada no SNC e, o conseqüente processo degenerativo da EM, envolve a ativação de células imunes periféricas e células residentes do tecido, como astrócitos, micróglia e oligodendrócitos. Numa primeira fase, células apresentadoras de antígenos (APCs), como as células dendríticas (DCs), apresentam autoantígenos derivados da mielina às células T naïve autorreativas nos órgãos linfóides periféricos (66). Uma vez ativadas, estas células migram para o parênquima do SNC a

partir de vasos das leptomeninges (66, 67). Na segunda fase da resposta inflamatória, os linfócitos T são reativados no SNC por células apresentadoras de antígenos residentes. Assim, ocorre uma produção secundária de metaloproteinases e citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF, IL-17A, GM-CSF e IFN γ . Esses eventos aumentam a permeabilidade de BHE, promovem o recrutamento de monócitos inflamatórios e neutrófilos para o local e ativam células gliais, particularmente astrócitos e micróglia (68). A resposta inflamatória local promove a desmielinização, as lesões neuro-axonais e danos em oligodendrócitos (ODC) por meio da produção de ROS, mediadores solúveis (complemento e citocinas) e, provavelmente, pela produção de auto-anticorpos. (69). Essa cascata de componentes inflamatórios no SNC acarreta na interrupção da sinalização neuronal, refletindo no surgimento de déficits neurológicos característicos da esclerose múltipla (67).

Diversos mecanismos estão envolvidos na regulação da patogênese da EM pelos astrócitos reativos. A produção de quimiocinas, incluindo CCL2, CXCL10, CXCL12 e CXCL1, parece impactar diretamente no desenvolvimento da doença (13). Estudos demonstraram que a deleção condicional de CCL2 em astrócitos (células GFAP⁺) diminuiu o acúmulo de monócitos (CD11b⁺/Ly6C^{hi}) no SNC e a ativação microglial (CD11b⁺CD45^{lo}), levando a menor desmielinização e perda de axônios, com consequente melhora na progressão da EAE (70, 71).

De modo semelhante, a deleção condicional de CXCL10 em astrócitos, reduz o escore clínico da doença e a desmielinização da medula espinhal, não afeta a composição dos infiltrados de células imunes, mas promove o acúmulo de células T CD4⁺ nos espaços perivascularres (72). Além disso, os astrócitos também apresentaram expressão aumentada de CXCL12, quimiocina envolvida no recrutamento de monócitos e células T e B, em pacientes com EM (73).

Na EM e no EAE aguda, as proteínas de junções de oclusão, como claudinas e ocludinas, são reduzidas e a permeabilidade da BHE é aumentada, facilitando o recrutamento dos leucócitos para o SNC. A produção de IL-1 β , TNF, glutamato e óxido nítrico (NO) pelos astrócitos ativados, pode regular negativamente as proteínas de junções e ainda induzir apoptose de células endoteliais. A produção de CCL2 também desfaz as junções aderentes e reduz os níveis de expressão de claudina 5 (CLDN5) e ocludina. Por outro lado, as projeções finais dos astrócitos que envolvem os capilares/BHE também formam uma barreira física que pode influenciar no infiltrado de leucócitos para o SNC (74, 75). Eilam e colaboradores demonstraram que há uma perda

do corpo celular dos astrócitos, bem como de seus processos nas regiões perivasculares, em lesões de EM recém-formadas. Após 21 dias de indução da EAE também foi observado um desprendimento dos corpos celulares e das projeções astrogliais com os vasos sanguíneos, sugerindo que alterações morfológicas dos astrócitos podem impactar na neuroinflamação (74).

Estudos recentes demonstram que a depleção dos astrócitos promove um maior infiltrado de monócitos e células no SNC e piora os sinais clínicos durante a fase aguda do EAE (76, 77). Por outro lado, foi sugerido que a depleção dos astrócitos durante a fase de remissão da EAE reduz a gravidade da doença, limitando o recrutamento de leucócitos (71, 78, 79). Nesse sentido, subconjuntos específicos de astrócitos têm sido associados à patologia da EM. Liddel e colaboradores, foram um dos pioneiros a observar o aparecimento de astrócitos reativos (ativados) em múltiplas doenças neurodegenerativas, incluindo EM. Wheeler e colaboradores identificaram subtipos distintos que expressavam o fator de transcrição MAFK e, através da sinalização de GM-CSF, promovia a inflamação e neurodegeneração em EAE e EM (80). Por outro lado, também foi identificado um subconjunto de astrócitos anti-inflamatórios que expressam a glicoproteína 1 da membrana associada ao lisossomo (LAMP1; também conhecida como CD107a) e o ligante indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral (TRAIL, também conhecido como TNFSF). Os autores sugeriram que esses astrócitos (LAMP1⁺TRAIL⁺) limitam a patogênese da EAE induzindo a apoptose de células T via sinalização do receptor 5 (DR5) de morte TRAIL (81). Considerando os papéis críticos e diversos dos astrócitos na EM, ainda é um desafio classificar os subtipos de astrócitos envolvidos no desenvolvimento da doença e assim, determinar alvos terapêuticos promissores para esta doença autoimune do SNC.

1.5 Metabolismo no SNC e nos astrócitos

Em condições fisiológicas, o cérebro requer cerca de 20% da glicose e oxigênio do organismo, para restaurar os gradientes iônicos após a neurotransmissão. 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 (82).

Os astrócitos apresentam uma distribuição anatômica favorável para sentir o ambiente e responder frente às mudanças extracelulares. Através dos numerosos processos em contato com os capilares cerebrais e com as sinapses neuronais, essas

células são reguladores multifuncionais do acoplamento neuro-metabólico. Pela expressão de transportadores específicos, controlam os níveis de neurotransmissores nas fendas sinápticas e os íons extracelulares, além de fornecerem substrato aos neurônios, naturalmente desprovidos de reserva energética (33). Conforme citado anteriormente, nas projeções terminais em torno dos vasos sanguíneos, os astrócitos expressam GLUT1, que permite a difusão facilitada da glicose. A atividade desse transportador é estimulada por glutamato (liberado pelos neurônios), mecanismo pelo qual une a atividade sináptica com o suprimento energético (83-85). A glicose nos astrócitos é fosforilada pela hexoquinase tipo I (HK1) e pode ser processada por diferentes vias metabólicas, tais como a glicólise, a via das pentoses fosfato e a glicogênese.

Os astrócitos apresentam baixas taxas do metabolismo oxidativo em comparação com os neurônios, uma vez que grande parte da glicose que entra na via glicolítica é liberada como lactato no espaço extracelular (86, 87). O perfil glicolítico dos astrócitos e sua preferência pela produção de lactato são resultado da expressão de genes específicos que envolve enzimas e transportadores, os quais atuam em conjunto para produzir esse fenótipo. Dentre estas, destaca-se a expressão da lactato desidrogenase 5 (LDH5), que favorece a conversão de piruvato em lactato. Por outro lado, os neurônios expressam, preferencialmente a lactato desidrogenase 1 (LDH1), que converte o lactato em piruvato (88). Os astrócitos também apresentam baixos níveis de expressão do transportador de aspartato/glutamato (AGC), um componente do transporte malato-aspartato que opera na transferência de NADH do citosol para as mitocôndrias (89, 90). Assim, apresentam uma alta razão NAD^+/NADH , essencial para sustentar vias glicolíticas (91).

Em relação ao glicogênio, os astrócitos são as principais células que atuam como reservas desse metabólito no SNC (92). Assim, em situações de privação de glicose, trabalhos demonstram sua importância para manutenção da função axonal e transmissão sináptica, de modo a favorecer a manutenção da homeostase do SNC em condições de hipoglicemia sistêmica (93). A metabolização de ácidos graxos por astrócitos também é importante para a atividade sináptica, dada a expressão exclusiva do complexo ácido graxo sintase nos astrócitos (94).

1.6 A via das Hexosaminas

A glicose é um nutriente crucial para o metabolismo energético das células. Além da função energética, a glicose participa na biossíntese de outras moléculas, como lipídeos, aminoácidos, ácidos nucleicos e outros sacarídeos. Uma dessas rotas é chamada

de via das hexosaminas (VH) que resulta na produção de UDP-GlcNAc (Uridina difosfato N-acetil-D-glicosamina) através da integração do catabolismo da glicose, de nucleotídeos, aminoácidos e lipídeos (95).

A VH inicia-se com a fosforilação da glicose pelas hexoquinases produzindo a glicose-6-fosfato (G6P). Na rota glicolítica, a G6P é convertida pela fosfoglicoisomerase à frutose-6-fosfato (F6P), um intermediário comum para as demais reações da glicólise e para a VH. Estima-se que cerca de 2 a 3% da glicose captada é desviada para a VH, especialmente em adipócitos cultivados *in vitro*, sendo necessário estudos adicionais para entender como a glicose flui através desta via em diferentes condições de crescimento e tecidos.

Na via das hexosaminas, a F6P será metabolizada pela enzima frutose-6-fosfato aminotransferase (GFAT) (95-97). Existem duas isoformas para esta enzima, a GFAT1 e a GFAT2, com 75-80% de homologia estrutural, atividade funcional similar e com diferente distribuição no organismo. Na região N-terminal da GFAT existe um domínio glutaminase que hidrolisa a glutamina em glutamato e amônia. A região C-terminal abriga domínios de isomerase que convertem F6P em glicosamina-6-fosfato (GlcN6P). Esta reação é a etapa limitante da via das hexosaminas. A GlcN6P é substrato da enzima GNPAT1 (glicosamina-6P Nacetiltransferase), que utiliza uma molécula de acetil-CoA para formar o N-acetil-D-glucosamina-6P (GlcNAc6P). Este intermediário é então convertido pela fosfoglicomutase 3 (PGM3) em Nacetil-D-glicosamina-1P (GlcNAc1P), que recebe um nucleotídeo ativador na sua estrutura através da enzima UAP1 (UDP-N-acetilglicosamina pirofosforilase-1) para formar o produto final da via, o UDP-N-Acetil-D-Glicosamina (UDP-GlcNAc). O UDP-GlcNAc é precursor de outros aminoácidos necessários para a biossíntese de glicoproteínas, glicolipídios, proteoglicanos e glicosaminoglicanos em organelas como complexo de golgi e retículo endoplasmático. Além da função estrutural, o UDP-GlcNAc tem uma função modulatória crucial para eucariotos superiores e é substrato para as reações de O-GlcNAcilação (98).

A O-GlcNAcilação é uma mudança pós-traducional na qual uma molécula de GlcNAc é inserida nas hidroxilas de resíduos de serina ou treonina de proteínas alvos localizadas no citoplasma, no núcleo ou nas mitocôndrias. A O-GlcNAcilação (β -N-acetilglicosamina ligada a uma molécula de O) de proteínas regula diversos processos biológicos, incluindo proliferação celular, ativação do sistema imunológico, apoptose, resposta ao estresse, tráfego de proteínas e detecção de nutrientes.

Diferente das demais mudanças pós-traducionais, a O-GlcNAcilação é catalisada por duas enzimas: a OGT (O-GlcNAc transferase) e a OGA (O-GlcNAcase) (99). Assim, a O-GlcNAcilação, não depende apenas da disponibilidade do substrato final UDP-GlcNAc, mas também da disponibilidade de nutrientes, da atividade e abundância das enzimas OGT e OGA que vão regular esse processo. Existem 3 isoformas de OGT que compartilham o domínio catalítico carboxiterminal e o domínio de ligação ao fosfatidilinositol, mas diferem no tamanho da região aminoterminal e na localização subcelular. Estão presentes no núcleo do citoplasma, o ncOGT (nucleocitoplasmática) e a sOGT (pequena OGT), enquanto a mOGT (mitocondrial) está localizada na membrana interna da mitocôndria. Além da OGT clássica, existe outra enzima denominada eOGT, a qual está localizada no retículo endoplasmático, que também catalisa a O-GlcNAcilação em proteínas extracelulares (99).

A OGT apresenta mais de 4.000 alvos e pode modular diversas classes de proteínas, que incluem fatores de transcrição, nucleoporinas, reguladores epigenéticos, proteínas mitocondriais, quinases, enzimas e proteínas estruturais (99, 100). Por outro lado, sua atividade é regulada por diferentes mecanismos – *splicing* alternativo, expressão gênica, formação de oligômeros que permitem maior interação com os substratos, modificações pós-traducionais, disponibilidade de seus substratos e pelo fluxo de nutrientes (99, 101).

A OGA é altamente conservada entre as espécies e apresenta duas isoformas: a ncOGA (nucleocitoplasmática), que apresenta o domínio aminoterminal com atividade O-GlcNAc hidrolase e o domínio carboxiterminal com atividade tipo histona acetiltransferase (HAT-like) e a isoforma curta (sOGA), a qual perde o domínio HAT-like localizado no retículo endoplasmático e nas âncoras de membrana. Semelhante a OGT, a OGA é capaz de se ligar a diversos substratos proteicos diferentes para exercer suas funções (99, 102).

O equilíbrio da atividade destas duas enzimas no controle dos níveis de O-GlcNAc é indispensável para a manutenção da homeostase e para a sobrevivência. A O-GlcNAcilação é requerida para o crescimento e a sobrevivência celular, por meio da sustentação de vias de sinalização, captação de nutrientes, degradação de proteínas mal dobradas, redução de vias pro-apoptóticas e homeostase do retículo endoplasmático (103).

1.7 A O-GlcNAcilação em células imunes

Diversos estudos sugerem que a O-GlcNAcilação de moléculas envolvidas com a cascata inflamatória pode regular a ativação das células imunes. Sob condições hiperglicêmicas, por exemplo, a O-GlcNAcilação da subunidade p65 do fator de transcrição NF- κ B aumenta a atividade transcricional ao diminuir a ligação de I κ B α , uma proteína reguladora que inibe a atividade do complexo NF- κ B (104). Allison e colaboradores demonstraram que a O-GlcNAcilação aumenta a atividade transcricional de NF- κ B por meio da sua acetilação. Os ensaios de imunoprecipitação de cromatina demonstraram que, após ativação com TNF, a OGT se localiza em promotores regulados por NF- κ B aumentando a acetilação da porção p65 (105).

Em células T, Ramakrishnan e colaboradores demonstraram que altas concentrações de glicose induzem a O-GlcNAcilação da serina 350 de c-Rel, uma subunidade de NF- κ B. Mutações desse domínio impediram a O-GlcNAcilação e a indução de moléculas *downstream* ao NF- κ B (IL-2, IFN γ e CSF2) (106).

A OGT regula funções adicionais em células T. A O-GlcNAcilação de NFAT inibe a produção de IL-2 (107). A produção de IL-17A por células Th17 é aumentada em pelo tratamento com Thiamet-G (TMG), um inibidor seletivo de OGA. Esses mecanismos foram correlacionados a maior ligação do fator de transcrição ROR γ t ao promotor da IL-17 (108). Em células T reguladoras (Tregs) a O-GlcNAcilação estabiliza o fator de transcrição FOXP3 e ativa STAT5. Treg deficientes em O-GlcNAc desenvolvem-se normalmente, mas exibem função efetora e estabilidade de linhagem prejudicados (109).

Em macrófagos, o papel da O-GlcNAcilação permanece inconclusivo. Ryu e colaboradores demonstraram que a enzima OGT é modificada por S-nitrosilação em macrófagos murinos. Quando estimulados com LPS, a OGT é desnitrosilada, o que aumenta a O-GlcNAcilação de p65. Em contrapartida, a atenuação da O-GlcNAcilação reduz a translocação nuclear de p65, resultando na diminuição da produção de NO e IL-1 β (110). Li e colaboradores demonstraram que macrófagos desafiados com o vírus da estomatite vesicular (VSVs) apresentavam um aumento na O-GlcNAcilação. Essa modificação pós-traducional regula a função de MAVS e assim, controla a resposta imune antiviral, observado através da redução na produção de citocinas como IFN- β (111).

Em contrapartida, a O-GlcNAcilação de STAT3 na treonina 717 parece regular negativamente sua fosforilação e reduzir a produção de IL-10 em macrófagos (112). Em um outro estudo, apesar do aumento das vias da glicólise e da pentose-fosfato, a ativação

de macrófagos com LPS resultou em uma atividade reduzida das enzimas da via das hexosaminas. A deleção da OGT especificamente em células LysM⁺ levou a uma maior ativação da resposta imune inata e exacerbação da inflamação em um modelo de sepse. Mecanicamente, a O-GlcNAcilação de RIPK3 impediu sua interação com RIPK1 e a consequente indução de necroptose (113).

1.8 A O-GlcNAcilação no sistema nervoso central: homeostase e na doença

Embora a enzima OGT esteja distribuída por todo o corpo, ela é particularmente abundante no SNC. Estudos recentes sugerem que a modulação da O-GlcNAcilação no cérebro altera funções sinápticas e neuronais, impactando no desenvolvimento de doenças neurodegenerativas.

No SNC, a O-GlcNAcilação é fundamental na fisiologia do tecido e sobrevivência neuronal. Estudos descrevem que a deleção de OGT causa letalidade das células-tronco embrionárias, enquanto a ausência da OGA leva à letalidade perinatal (95, 114, 115). Embora os mecanismos ainda não estejam claros, a eliminação de OGT e OGA especificamente em neurônios resulta em graves anormalidades no sistema nervoso, marcada principalmente pela neurodegeneração progressiva, que inclui morte neuronal, déficits de memória e aumento da produção da proteína tau hiperfosforilada e peptídeos β amiloides. Algumas evidências sugerem que as deficiências cognitivas observadas durante o envelhecimento podem ser resultantes da diminuição da expressão de OGT e, conseqüentemente, da O-GlcNAcilação em neurônios. Wheatley e colaboradores apontaram que a superexpressão de OGT em neurônios do hipocampo de camundongos geriátricos é capaz de resgatar as deficiências relacionadas à idade no aprendizado espacial e na memória (116).

Na doença de Alzheimer (DA), sugere-se que a O-GlcNAcilação cerebral possa ser de até 50% menor. Park e colaboradores demonstraram que o aumento da O-GlcNAcilação pela deleção de OGA em animais 5XFAD (modelo animal para DA) melhora a função cognitiva, diminui o acúmulo de placas A β , a perda neuronal, a neuroinflamação e a recuperação da atividade fagocítica da micróglia. Os autores sugeriram que o papel protetor exercido pela OGT na DA pode ser devido à O-GlcNAcilação de RIPK3, que inibe a necroptose (114). Mecanicamente, a O-GlcNAcilação pode modular o desenvolvimento da DA por modificar as duas principais proteínas envolvidas na doença: a proteína β -amiloide, formada através da clivagem da proteína precursora amiloide (APP) e a proteína Tau. Na literatura, trabalhos demonstram

que a O-GlcNAc em resíduos da APP leva a uma menor taxa de clivagem, diminuindo a formação e a deposição de placas β -amiloides (117). Além disso, a maior atividade da enzima OGT parece prevenir a hiperfosforilação e agregação da proteína Tau, inibindo a formação dos agregados neurofibrilares ao longo do SNC (118, 119).

Existem relatos de que a O-GlcNAcilação também desempenha um papel neuroprotetor na patologia da Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA). Camundongos com superexpressão de SOD1 (modelo animal para ELA) apresentam níveis reduzidos de O-GlcNAc em neurônios motores da medula espinhal comparado com camundongos controles (115).

Na doença de Parkinson (DP), a proteína α -sinucleína tem papel central no desenvolvimento da doença, sendo expressa principalmente nos terminais pré-sinápticos e nas vesículas sinápticas. Tal como acontece com outras proteínas propensas à agregação, a fosforilação da α -sinucleína pode gerar agregação anormal e formar os “corpos de Lewy”, capaz de perturbar significativamente a estrutura e função celular, o que eventualmente causa morte neuronal (120). A α -sinucleína também é uma proteína alvo do processo de O-GlcNAc. Estudos indicam que a O-GlcNAcilação de α -sinucleína pode atenuar a agregação patológica e assim, a neurotoxicidade mediada pela proteína, especialmente *in vitro* (121).

1.9 A O-GlcNAcilação nos astrócitos

Nos últimos anos, alguns trabalhos têm estudado o papel da O-GlcNAcilação em astrócitos. Em 2019, Rahman e colaboradores investigaram se a O-GlcNAcilação regula a autofagia em astrócitos, cujo processo está intimamente associado à neurodegeneração. Os autores demonstraram que a inibição da OGT por aloxano e siRNA é capaz de aumentar a autofagia através da indução da proteína de membrana associada aos lisossomos 1 (LAMP-1) (122).

Fan e colaboradores investigaram se a OGT expressa em astrócitos poderia influenciar a expressão de proteínas no córtex pré-frontal medial (mPFC), uma região do SNC que está relacionada com a regulação do comportamento e atua no controle das emoções, cognição social e tomada de decisão. A disfunção dos astrócitos no mPFC tem sido implicada em vários distúrbios neuropsiquiátricos, como transtorno depressivo maior, epilepsia, transtornos de ansiedade e déficits de aprendizado e memória. Para isso, deletaram a OGT especificamente nos astrócitos e realizaram uma análise proteômica da região do mPFC. Através das análises de bioinformática foi possível observar uma

alteração de diversas proteínas em decorrência da ausência da OGT, sendo elas relacionadas a processos metabólicos, biossintéticos e atividade transferase. O metabolismo de alanina, aspartato e glutamato e a via de sinalização JAK/STAT, por exemplo, estiveram enriquecidas entre as proteínas reguladas positivamente. Além disso, o GFAP, um marcador de astrócitos reativos, aumentou após a deleção de OGT. Esses resultados forneceram uma base para estudos futuros sobre o papel da OGT/O-GlcNAcilação na função dos astrócitos no mPFC (123).

Complementando o estudo anterior, Fan e colaboradores sugeriram o papel da O-GlcNAcilação em astrócitos, especialmente na região de mPFC na modulação do comportamento depressivo. A deleção seletiva de OGT em astrócitos resultou em efeitos do tipo antidepressivo nos camundongos. Além disso, a OGT modulou a transmissão sináptica glutamatérgica através da O-GlcNAcilação de GLT-1 em astrócitos. O nocaute específico de astrócitos da OGT preservou a atrofia da morfologia neuronal e os déficits de atividade de Ca^{2+} causados pelo estresse crônico e resultou em efeitos antidepressivos. O estudo revela que a OGT nos astrócitos no mPFC regula comportamentos do tipo depressivo por meio da O-GlcNAcilação de GLT-1 (124).

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o papel da O-GlcNAcilação nas funções neuroinflamatórias dos astrócitos.

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Determinar o perfil de expressão da OGT em astrócitos em condições neuroinflamatórias *in vitro* e *in vivo*;

2.2.2 Avaliar a atividade da OGT em astrócitos em condições neuroinflamatórias *in vitro* e *in vivo*.

2.2.3 Investigar a participação da OGT em astrócitos em condições fisiológicas e neuroinflamatórias.

2.2.4 Investigar os possíveis mecanismos pelos quais a OGT expressa em astrócitos participa do desenvolvimento da neuroinflamação.

3. Materiais e Métodos

3.1 Experimentação animal

Foram utilizados camundongos isogênicos selvagens (*wild type*, WT) da linhagem C57BL/6 provenientes do Biotério Central da Universidade de São Paulo – Campus Ribeirão Preto (USP/RP). Camundongos *Aldh111-Cre* (*Aldh111-cre/ERT2*)1Khakh/J) e *Ogt-Flox* (*Ogt^{tm1Gwh}/J*) foram obtidos da The Jackson Laboratories e expandidos *in house*.

Os animais utilizados nos experimentos foram acondicionados no biotério do Departamento de Farmacologia da FMRP-USP, com temperatura ambiente 23-25°C, ciclo claro-escuro de 12 horas e acesso livre à comida e água. Camundongos de 8-10 semanas de idade e pareados por sexo foram utilizados para experimentação. Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com as normas do Comitê de Ética na Utilização de Animais da Faculdade de Ribeirão Preto (CEUA - FMRP/USP), número de protocolo 29/2020.

3.1.1 Depleção da enzima OGT em astrócitos

Para depleção da enzima OGT em astrócitos dos animais geneticamente modificados (*Aldh111^{creER}:Ogt^{fl/fl}*), foi administrado 100µL de tamoxifeno (Sigma-Aldrich) intraperitonealmente (i.p.) nos animais com seis semanas de idade, na concentração de 75 mg/kg, durante cinco dias consecutivos.

3.1.2 Indução da Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE)

A indução da EAE foi realizada seis semanas após o fim do tratamento com tamoxifeno, quando os animais *Aldh111^{creER}:Ogt^{fl/fl}* tinham 12 semanas de idade. Os camundongos foram imunizados por via subcutânea (s.c.) em ambos os lados dos flancos posteriores, com emulsão contendo 300µg de MOG₃₅₋₅₅ (glicoproteína da mielina de oligodendrócitos; Genemed Synthesis) em CFA (adjuvante completo de Freund; Sigma-Aldrich) suplementado com 5 mg/mL de *Mycobacterium tuberculosis* (H37RA, Difco).

Adicionalmente, cada animal recebeu 200 ng de toxina pertussis (Sigma-Aldrich) em 200µL de solução salina por via i.p. nos dias 0 e 2 após imunização. Os animais foram imunizados sob anestesia com isoflurano (2%).

Os sinais clínicos da EAE foram monitorados diariamente de acordo com escala previamente padronizada: 0 = sem sinais clínicos; 0,5 = cauda parcialmente flácida; 1,0

= cauda flácida; 1,5 = perda da coordenação motora; 2,0 = paresia (fraqueza) dos membros posteriores; 2,5 = paralisia parcial dos membros posteriores; 3,0 = paralisia total dos membros posteriores; 3,5 = paralisia total dos membros posteriores e fraqueza de membros anteriores; 4,0 = para paralisia unilateral de membros anteriores; 4,5 = paralisia total de membros anteriores; e 5, 0 = moribundo.

3.2 Análises de bioinformática

Dados públicos de scRNA-Seq disponibilizados em Gene Expression Omnibus (GEO) sob o número de acesso GSE1301119 foram utilizados para análise do perfil transcricional de células da medula espinal de animais submetidos à EAE (*naive* = 6, *priming* = 4, *peak* = 6, *remission* = 6). A expressão gênica de enzimas glicolíticas foram determinadas através de tSNE *plot*.

3.3 Cultura primária de astrócitos

Foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6 (WT) recém-nascidos (entre 0 e 2 dias). Um dia antes da cultura todo o material necessário foi autoclavado. Os animais foram higienizados com álcool 70% e, após anestesia, decapitados. Sob lupa estereoscópica, em meio DMEM incompleto, o córtex cerebral foi isolado e as meninges cerebrais removidas.

Os tecidos foram homogeneizados e dispersos até o nível unicelular passando por um filtro de células (70 µm). Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em DMEM-high glucose, contendo penicilina, fungizona, glutamina e soro fetal bovino 10% e cultivado a 37°C em garrafas de cultura de 75cm². O meio foi substituído a cada 4 dias. Após as células atingirem confluência desejada (10-12 dias), iniciou-se o processo de isolamento e enriquecimento da população de astrócitos. As garrafas foram colocadas em um *shaker* orbital a 200 rpm durante quatro horas, com troca do meio a cada 2 horas. No final desse intervalo, foi adicionada tripsina para a remoção das células aderidas ao fundo da garrafa. O enriquecimento dos astrócitos foi realizado através da utilização de microesferas magnéticas anti-ACSA2 (Miltenyi Biotec).

3.4 Processamento de tecidos para citometria de fluxo

Camundongos naive ou submetidos a EAE foram anestesiados e perfundidos transcardialmente com PBS 1x gelado. A medula espinhal foi coletada, cortada em

pequenos pedaços e digeridas por 30 min a 37°C com colagenase D (2,5 mg/ml; Roche Diagnostics). As células foram isoladas pela passagem do tecido através de um filtro celular de 70 µm, seguido de centrifugação em gradiente Percoll 30% (GE Healthcare). A camada de mielina na superfície foi retirada e o pellet restante utilizado para realizar as marcações com anticorpos específicos. Os linfonodos drenantes também foram processados e digeridos com colagenase IV (0,2mg/ml) por 30 min a 37°C. Após digestão, as células foram filtradas em filtro de células de 100 µm e ressuspendidas em PBS1x para a marcação.

3.5 Citometria de fluxo

Para a marcação de moléculas de superfície, as suspensões celulares foram incubadas com anticorpos conjugados à fluorocromos diluídos em uma solução de PBS1x e BSA 1% por 30 minutos a 4°C. Em algumas ocasiões, para identificação das citocinas intracelulares, as células foram estimuladas com forbol 12-miristato 13- acetato (PMA) (50 ng/mL; Sigma-Aldrich) e ionomicina (500 ng/mL; Sigma-Aldrich) na presença de um inibidor do transporte de proteínas contendo monensina (*GolgiStop* 1.5 mg/mL; BD Biosciences) em meio IMDM completo por 4 h (37°C, 5% CO₂). Após a marcação dos antígenos de superfície, as células foram fixadas e permeabilizadas utilizando um kit de fixação/permeabilização (*Foxp3 Fixation/Permeabilization Kit*; Invitrogen) de acordo com as especificações do fornecedor. A marcação dos alvos intracelulares foi realizada utilizando anticorpos monoclonais conjugados à fluorocromos. As células foram lavadas, ressuspendidas em 1X PBS e adquiridas em citômetro de fluxo (FACSVerse ou FACSCanto II; BD Biosciences). Os dados obtidos foram exportados e analisados usando o software FlowJo™ v10 (BD Biosciences).

Os seguintes anticorpos foram utilizados neste trabalho: Live/Dead-APC H7 (Invitrogen, 1:5.000), anti-CD11b-FITC (Biolegend, clone N418, 1:300), anti-ACSA-PE (Miltenyi Biotec, clone IH3-18A3, 1:300), anti-O-GlcNAc-APC (Novus Biologicals, clone RL2, 1:10.000), anti-CD4-FITC (Biolegend, clone RM4-5, 1:300), anti-IL17-BV421 (Biolegend, clone TC11-18H10, 1:300), anti-Foxp3-PE (clone PCH101, 1:300), anti-CD45-BV421 (eBiosciences, clone 2B11, 1:400), anti-Ly6G-APC (eBiosciences, clone 1A8, 1:300), anti-Ly6C-PERCP (eBiosciences, clone HK1.4, 1:250), anti-CCR2-PE (RD, clone 475301, 1:250), anti-CX3CR1-APC (Biolegend, clone SA011F11, 1:250), anti-CD11c-BV421 (Biolegend, clone N418, 1:300).

3.6 qPCR

O lisado celular da cultura de astrócitos foi armazenado em tampão de lise para posterior extração de RNA (RNeasy Micro Kit, Qiagen, Hilden, Alemanha). A extração do RNA seguiu conforme recomendações da empresa fabricante. A síntese de cDNA foi realizada utilizando o *kit* de transcrição reversa High-Capacity (Invitrogen Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA). O cDNA foi utilizado para a realização do PCR em tempo real em um StepOne Plus RealTime PCR System, utilizando o sistema de fluorescência SYBR-green® Master Mix (Invitrogen, Carlsbad, USA).

Foram utilizados os seguintes primers:

Gene	Sequência 5'->3'
<i>Gapdh</i>	F: GGGTGTGAACCACGAGAAAT e R: CCTTCCACAATGCCAAAGTT
<i>Gfap</i>	F: TCTAAGGGAGAGCTGGCAGGGCT e R: AGGGCGAAGAAAACCGCATGACC
<i>Il6</i>	F: TTCCTACCCCAATTTCCAAT e R: CCTTCTGTGACTCCAGCTATC
<i>Mcp1</i>	F: ATGAGTCGGCTGGAGAAC e R: GTGGAAAAGAGAGTGGAT
<i>Cxcl1</i>	F: ACCCGCTCGTTCTCTGT e R: AAGGGAGCTTCAGGGTCAAG
<i>Hif1a</i>	F: CCTGCACTGAATCAAGAGGTTGC e R: CCATCAGAAGGACTTGCTGGCT
<i>Pdk1</i>	F: CCACTGAGGAAGATCGACAGAC e R: AGAGGCGTGATATGGGCAATCC
<i>Glut1</i>	F: GCTTCTCCAACCTGGACCTCAAAC e R: ACGAGGAGCACCGTGAAGATGA
<i>Hk1</i>	F: GAAAGGAGACCAACAGCAGAGC e R: TTCGTTCCCTCCGAGATCCAAGG
<i>Hk2</i>	F: CCCTGTGAAGATGTTGCCACT e R: CCTTCGCTTGCCATTACGCACG
<i>Pfkfb3</i>	F: TCATCGAGTCGGTCTGTGACGA e R: CATGGCTTCTGCTGAGTTGCAG
<i>Pkm1</i>	F: CAGAGAAGGTCTTCCTGGCTCA e R: GCCACATCACTGCCTTCAGCAC
<i>Pkm2</i>	F: CAGAGAAGGTCTTCCTGGCTCA e R: GCCACATCACTGCCTTCAGCAC
<i>Gfpt1</i>	F: AGC CCTCTGTTGATTGGTGT e R: TCCATCTGGAGTGT TTGCAC
<i>Ogt</i>	F: TCGTAGTACACACAAGCCAGG e R: AGGAAATGTCTTGAAAGAGGCAC
<i>Oga</i>	F: ACTGTGCCAACAGGACCATCCT e R: CTGTGCTGAAGAGTGACTACGAC

3.7 ELISA

A determinação dos níveis de citocinas do sobrenadante das culturas foi realizada por método imunoenzimático, sendo utilizados os kits da empresa R&D Systems, realizados de acordo com as instruções do fabricante. O *coating* da placa foi realizado

overnight a 4°C com anticorpo de captura diluído em PBS 1x (50 µL/poço). Foram dosadas as seguintes citocinas/quimiocinas: IL-6, CCL2, CXCL1, CXCL10, IL-10, GM-CSF, IFN γ . A curva padrão foi realizada nas concentrações a partir de 2.000 pg/mL - com exceção de CXCL10 (6.000 pg/mL).

As placas foram bloqueadas de ligações inespecíficas através da adição de 100 µL de PBS-BSA 1% durante duas horas, em temperatura ambiente. As amostras de interesse foram incubadas *overnight* a 4°C e, após a lavagem, adicionou-se o anticorpo de detecção conjugado a enzima peroxidase (50 µL/poço). Por fim, o complexo estreptavidina-biotina (1:40 em PBS-BSA 1%) foi adicionado seguido de Tetrametilbenzidina (KPL SeraCare) para a detecção de quimiluminescência. A densidade óptica foi lida após acréscimo de ácido sulfúrico. Os valores de concentração das proteínas foram fornecidos em pg/mL.

3.8 Western Blotting

O lisado celular da cultura de astrócitos foi homogeneizado em tampão RIPA. Uma alíquota foi separada para dosagem de proteínas totais pelo método de BCA numa curva padrão entre 1,5 e 0,1 µg/mL. Amostras do homogeneizado foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE e transferidas para membranas de nitrocelulose. As membranas foram posteriormente incubadas *overnight* a 4°C com solução de bloqueio de leite desnatado 5% (Cell Signaling). Após a lavagem, as membranas foram incubadas com anticorpos primários anti-OGT (Cell Signaling, 1:1.000 em BSA 5%), anti-O-GlcNac (Abcam, 1:1.000 em BSA 5%) e anti-GFAT2 (Sigma, 1:1.000 em BSA 5%). Posteriormente, foi feita a incubação das membranas com anticorpo secundário anti-*rabbit* e anti-*mouse*, conjugados com peroxidase (1:5.000 em leite 5%) e, então, foram reveladas com kit de quimioluminescência (ECL, Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, U.K.). Como controle endógeno, utilizou-se o anticorpo primário anti- β -actina (Cell Signaling, 1:1.000 em BSA 5%).

3.9 Seahorse

A OXPHOS, que representa a respiração mitocondrial, foi determinada pela taxa de consumo de oxigênio (OCR, do inglês *Oxygen Consumption Rate*) das células, através do analisador de Fluxo Extracelular XF96 Seahorse Bioscience (Agilent). Astrócitos diferenciados *in vitro* foram ressuspendidas em meio Seahorse XF RPMI 1640 suplementado com 2,5 mM de glicose, 1 mM de piruvato e 2 mM de L-glutamina.

Microplacas Seahorse XF96 foram previamente tratadas com poli-L-lisina (Sigma-Aldrich) overnight, a 4 °C. Em seguida, as placas foram lavadas e as células ($1,5 \times 10^5$ células/poço) foram incubadas por 1 h, 37 °C, na ausência de CO₂. Nesses experimentos, foram utilizados os protocolos do *Mito Stress*, que consiste na adição sequencial de 4 µM de oligomicina, 3 µM de carbonil cianeto-4-(trifluorometoxi) fenilhidrazona (*carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone*; FCCP) e 3 µM de rotenona/antimicina A (todos da Sigma-Aldrich). As medidas de cada experimento foram realizadas em triplicata. Os parâmetros foram calculados da seguinte forma: Respiração basal: OCR antes da oligomicina - OCR após rotenona/antimicina A; Respiração máxima: OCR após FCCP - OCR após rotenona/antimicina A; Produção de ATP: respiração basal - valor mínimo de OCR após oligomicina. A taxa de acidificação extracelular (ECAR) do meio também foi avaliada durante o teste de estresse glicolítico, utilizando neste ensaio: glicose 20 mM, oligomicina 40 µM e 2-desoxiglicose 80 mM.

3.10 Imunofluorescência

Para os experimentos de imunofluorescência, os animais foram eutanasiados e perfundidos com PBS 1x via intracardíaca, seguido por paraformaldeído 4% tamponado (pH 7,0). A medula espinhal foi coletada e criopreservada com sacarose 30% a 4°C. Em seguida, as amostras foram congeladas em meio preservante Tissue-Tek® O.C.T. e crio-seccionadas (60 µm). As secções foram inicialmente incubadas com *FluoroMyelin™ Red Fluorescent Myelin Stain* (Invitrogen, 1:5.000) e anticorpo primário anti-GFAP (Millipore, 1:200). Posteriormente, adicionou-se o anticorpo secundário conjugado com fluorocromo. As expressões de marcadores fluorescentes foram analisadas por microscopia confocal em um Leica TCS-SP5 AOBS.

3.11 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas por one-way ANOVA seguido por teste de Bonferroni (para três ou mais grupos), comparando todas as colunas. Two-way ANOVA foi utilizado para avaliação do decurso temporal do *score* da EAE entre os grupos. Para avaliar diferentes grupos de variáveis não-pareadas, utilizou-se o teste *T Student*. Valores com $P < 0,05$ foram considerados significativos estatisticamente. As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism 8.

4. Resultados

4.1 Padronização da cultura primária de astrócitos e avaliação da resposta frente a estímulos inflamatórios.

Iniciamos nossos estudos padronizando a cultura primária de astrócitos e caracterizando a resposta dessas células frente a estímulos inflamatórios. Conforme descrito em trabalhos anteriores, córtices de animais C57BL/6 recém-nascidos foram coletados e separados das meninges, o tecido foi macerado e as células recuperadas mantidas em garrafa de cultura entre 10 e 12 dias (77, 125). Após esse período, as amostras foram colocadas sob constante agitação, por 4 horas. O sobrenadante foi descartado e as células aderidas retiradas. Antes do plaqueamento, conforme verificado por citometria de fluxo, a população de astrócitos (células ACSA-2⁺) representava em torno de 70% das células (Fig. 1A), enquanto as micróglias (populações CD11b⁺), consistiam aproximadamente 7-10% do pool inicial (Fig. 1A).

Com o objetivo de excluir a potencial interferência de outros subtipos celulares em nosso sistema, microesferas anti-ACSA-2 foram utilizadas para o enriquecimento dos astrócitos. Ao final desse processo, células ACSA-2⁺ (astrócitos) rotineiramente representaram >95% da população presente em nossas culturas (Fig. 1B).

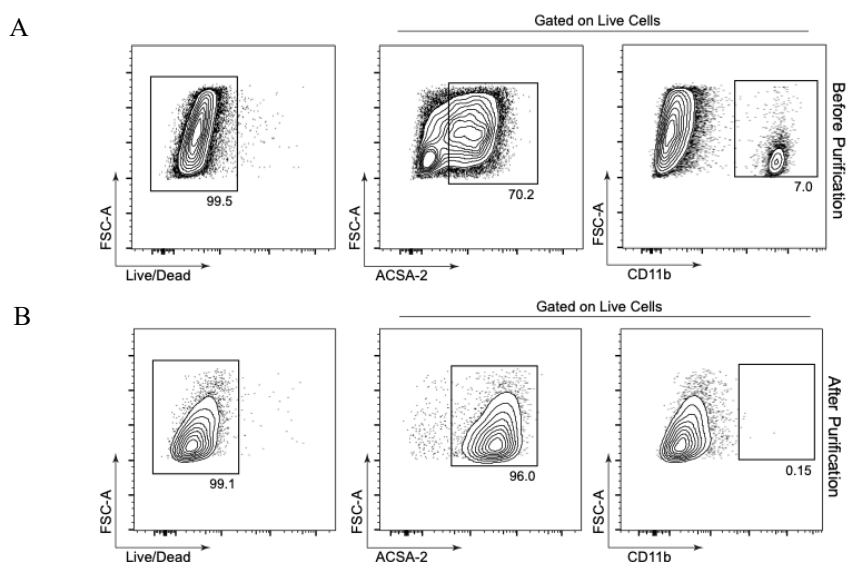


Figura 1. Purificação da cultura primária de astrócitos. Córtices de animais C57BL/6 recém-nascidos foram extraídos, macerados e as células obtidas foram mantidas em garrafas de cultura (10-12 dias). Posteriormente, microesferas anti-ACSA-2 foram utilizadas para o enriquecimento da população ACSA-2⁺ antes do plaqueamento. **(A)** Frequência de astrócitos (ACSA-2⁺) e micróglia (CD11b⁺) viáveis antes e **(B)** após a purificação. Os dados são representativos de três experimentos independentes realizados durante este trabalho.

Uma vez que a cultura foi satisfatoriamente padronizada, procuramos determinar como os astrócitos respondiam frente a um desafio inflamatório padrão – a citocina TNF. Ao se ligar nos receptores TNFR1 (p55) e/ou TNFR2 (p75) em astrócitos, o TNF ativa vias de sinalização relacionadas à proliferação celular e propagação da resposta inflamatória (126-128). Neste sentido, iniciamos por avaliar a expressão temporal gênica e proteica de conhecidos mediadores inflamatórios na presença de 10 ng/ml de TNF.

Conforme pode ser observado na Figura 2, houve um aumento significativo da transcrição de IL-6, CXCL1 e CCL2 ao longo de todo período analisado em relação ao meio não estimulado. *Il6* e *Cxcl1* apresentaram pico de expressão nas primeiras 6 horas (Fig. 2A). A análise da expressão proteica por ELISA corroborou as observações anteriores. IL-6, CXCL1 e CCL2 estiveram substancialmente concentrados no meio de cultura, especialmente 12 horas após o início do estímulo (Fig. 2B).

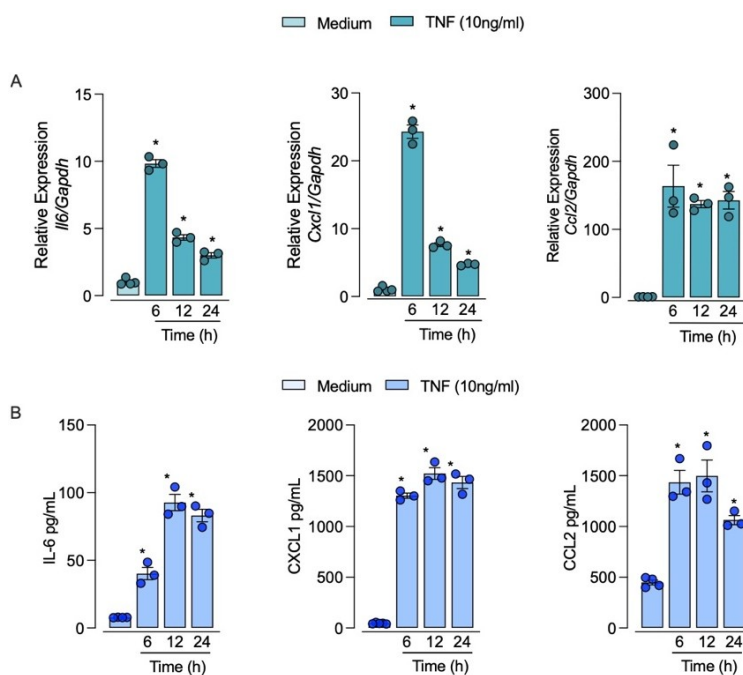


Figura 2. A ativação de astrócitos por TNF induz a expressão de mediadores inflamatórios. Cultura primária de astrócitos estimulada com TNF (10ng/ml) por 6h, 12h e 24h. **(A)** Análise da expressão gênica relativa de *Il6*, *Cxcl1* e *Ccl2* por RT-qPCR. **(B)** A concentração proteica dos mediadores inflamatórios presentes no sobrenadante da cultura foi mensurada por ELISA. Os dados foram expressos em média \pm E.P.M. * $P < 0,05$ em relação ao meio, analisados por One-way ANOVA seguido de pós-teste Bonferroni. Os dados são representativos de 3 experimentos independentes com resultados similares, sendo cada ponto uma amostra biológica.

Posteriormente, investigamos a relação entre a concentração de TNF e a produção desses mesmos mediadores. Conforme demonstrado na Figura 3, IL-6, CXCL1, CCL2 e CXCL10 foram induzidos em todas as concentrações testadas (0,1, 1 e 10 ng/ml). Com exceção do CCL2, todos responderam de maneira dose-dependente.

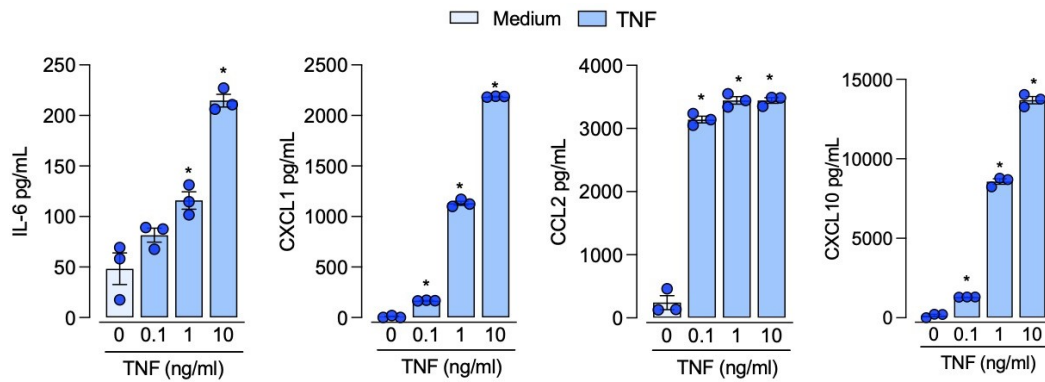


Figura 3. A ativação de astrócitos por TNF induz produção de mediadores inflamatórios de maneira dose-dependente. Cultura primária de astrócitos estimulada com TNF (0,1, 1 e 10ng/ml). (A) A concentração proteica de IL-6, CCL2, CXCL1 e CXCL10 foi mensurada por ELISA no sobrenadante da cultura após 12h de estímulo frente a diferentes concentrações da citocina. Os dados estão expressos em média \pm E.P.M. * $P < 0,05$ em relação ao meio, analisados por One-way ANOVA seguido de pós-teste Bonferroni. Os dados são representativos de 3 experimentos independentes com resultados similares, sendo cada ponto uma amostra biológica.

No contexto experimental, o lipopolissacarídeo (LPS) também tem sido amplamente empregado para mimetizar condições inflamatórias em cultura de células imunes e não imunes. A ativação do TLR4 pelo LPS leva a transcrição e produção de mediadores inflamatórios. Embora permaneça debatida a funcionalidade de TLR4 em astrócitos, avaliamos a responsividade dessas células frente ao desafio com LPS (59, 129). Na dose padrão de 10 ng/ml, observamos um aumento significativo da produção de IL-6, CCL2 e CXCL1 em todos os períodos analisados (Fig. 4A). Nesses estudos, o LPS demonstrou potência equivalente ao do TNF na promoção de IL-6 e CCL2. CXCL1, por sua vez, foi sutilmente mais secretada em culturas tratadas com TNF quando comparado com o LPS (Fig. 4B).

Em conjunto, essa bateria de experimentos demonstra que os astrócitos utilizados em nossas culturas (ACSA-2⁺) respondem eficientemente a dois estímulos inflamatórios clássicos, TNF e LPS. Tendo-se em vista que os eventos moleculares posteriores a ativação de TLR4 em astrócitos permanecem obscuros, optamos por prosseguir nossos estudos somente com o TNF.

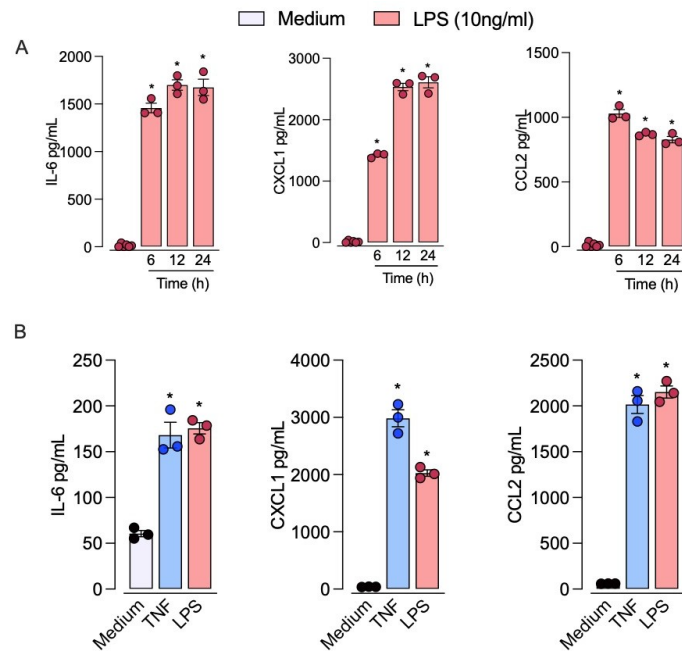


Figura 4. A ativação de astrócitos por LPS induz produção de mediadores inflamatórios. Cultura primária de astrócitos estimulada com LPS (10ng/ml) por 6h, 12h e 24h. **(A)** A concentração proteica de IL-6, CCL2, CXCL1 e CXCL10 foi mensurada por ELISA no sobrenadante da cultura coletada ao longo do decurso temporal. **(B)** A produção dos mediadores inflamatórios foi comparada entre células estimuladas com LPS (10ng/ml) e TNF (10ng/ml) por 12h e mensurada por ELISA. Os dados estão expressos em média \pm E.P.M. * $P < 0,05$ em relação ao meio, analisados por One-way ANOVA seguido de pós-teste Bonferroni. Os dados são representativos de 3 experimentos independentes com resultados similares, sendo cada ponto uma amostra biológica.

Estudos recentes sugerem que, em condições inflamatórias, a micróglia é responsável pela liberação de moléculas que modulam a função dos astrócitos, direcionando o destino funcional dessas células (130). Neste sentido, Liddelow e colaboradores observaram que, na presença de LPS, a micróglia induz a polarização de astrócitos pela produção de TNF, IL-1 α e C1q (os autores os chamaram de A1). Baseados nesses achados, decidimos investigar como os astrócitos cultivados em nossas condições respondem a tais mediadores.

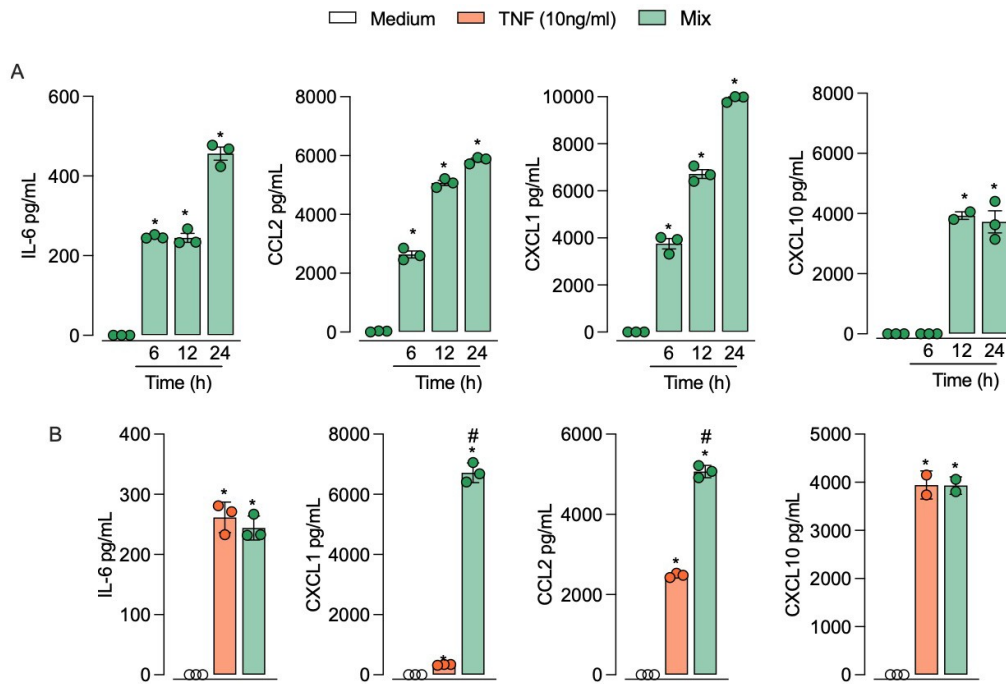


Figura 5. A ativação de astrócitos por TNF, IL-1 α e C1q induz maior produção de mediadores inflamatórios em comparação ao TNF. (A) Cultura primária de astrócitos estimulada com um conjunto de mediadores inflamatórios (Mix): TNF (10 ng/ml), IL-1 α (3 ng/ml) e C1q (400 ng/ml) por 6h, 12h e 24h. A concentração proteica dos mediadores inflamatórios presentes no sobrenadante da cultura foi mensurada por ELISA. **(B)** Cultura primária de astrócitos estimulada com mix ou apenas TNF (10ng/ml) por 12h. Os dados estão expressos em média \pm E.P.M. * $P < 0,05$ em relação ao meio, # $P < 0,05$ em relação ao TNF, analisados por One-way ANOVA seguido de pós-teste Bonferroni. Os dados são representativos de 2 experimentos independentes com resultados similares. Cada ponto representa uma amostra biológica.

Corroborando com a literatura, observamos que a combinação de TNF, IL-1 α e C1q (mix) induziu, significativamente, a produção de IL-6, CXCL1, CCL2 e CXCL10 em todos os períodos analisados, com pico ocorrendo 24 h após o início do estímulo (Fig. 5A). Conforme esperado, a utilização concomitante desses mediadores foi superior ao TNF sozinho no que diz respeito a produção de CXCL1 e CCL2 (Fig. 5B). Diante desses resultados, optamos por incluir o mix desses mediadores nos experimentos metabólicos realizados posteriormente.

4.2 Os astrócitos cultivados sob condições inflamatórias diminuem a capacidade glicolítica

Nos últimos anos, tornou-se evidente que as vias metabólicas são dinamicamente moduladas em células do sistema imunológico durante importantes funções biológicas. Dentre as mais variadas vias descritas, destacam-se a glicólise e a fosforilação oxidativa (OXPHOS). Para entender a reprogramação metabólica dos astrócitos frente ao desafio inflamatório com TNF, IL-1 α e C1q, avaliamos a expressão de enzimas participantes do metabolismo glicolítico – PDK1 (Piruvato Quinase Desidrogenase) que inibe a formação

de acetil-CoA a partir de piruvato, HIF-1 α (Fator Induzido por Hipóxia-1 α) que induz a glicólise anaeróbica da célula e GLUT-1 (Transportador de Glicose 1) que participa da captação de glicose pelas células. Em um decurso temporal, não observamos alterações significativas dos níveis transcricionais de *Pdk1* por qPCR (Figura 6A). Por outro lado, ao passo que *Hif1a* foi up-regulado de maneira tempo-dependente (Fig. 6B), *Glut1* foi inversamente regulado (Fig. 6C).

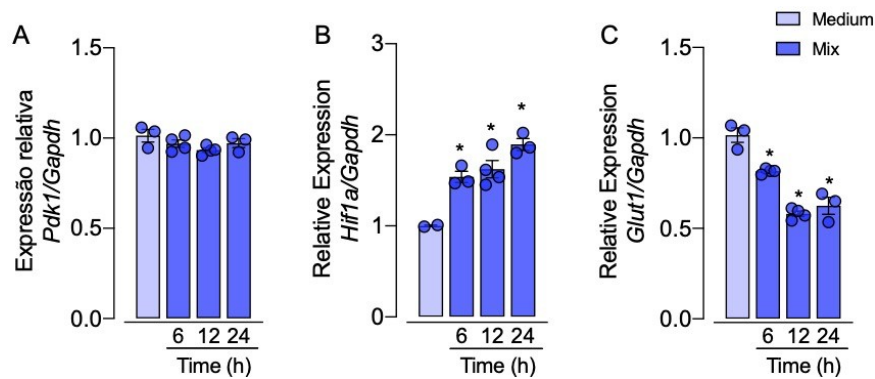


Figura 6. A ativação dos astrócitos por TNF, IL-1 α e C1q altera a expressão de enzimas responsáveis pela regulação do metabolismo glicolítico. Cultura primária de astrócitos estimulada com um conjunto de mediadores inflamatórios (Mix): TNF (10 ng/ml), IL-1 α (3 ng/ml) e C1q (400 ng/ml), por 6 h, 12 h e 24 h. Expressão gênica de (A) *Pdk1*, (B) *Hif1a* e (C) *Glut1* por RT-qPCR. Os dados são expressos em média \pm E.P.M. * $P < 0,05$ em relação ao meio, analisados por One-way ANOVA seguido de pós-teste Bonferroni. Os dados são representativos de 2 experimentos independentes com resultados similares. Cada ponto representa uma replicata biológica.

Posteriormente, avaliamos também a expressão das enzimas Hexoquinase (HK1/2), PFKFB3 (6-Fosfofruto-2-quinase/Frutose-2,6-bifosfatase 3) e PKM1/2 (Piruvato Quinase, sob a isoforma M em mamíferos). Houve um aumento significativo na expressão de *Hk1*, *Pkm1* e *Pkm2*, particularmente, 24h após o início do desafio inflamatório (Fig. 7B, D, E). *Hk2*, por sua vez, apresentou um pico de expressão inicial (6 h) e decaiu gradativamente nos períodos posteriores (Fig. 7C). Por outro lado, a transcrição de *Pfkb3* foi inversamente regulada, com diminuição de forma tempo-dependente (Fig. 7A).

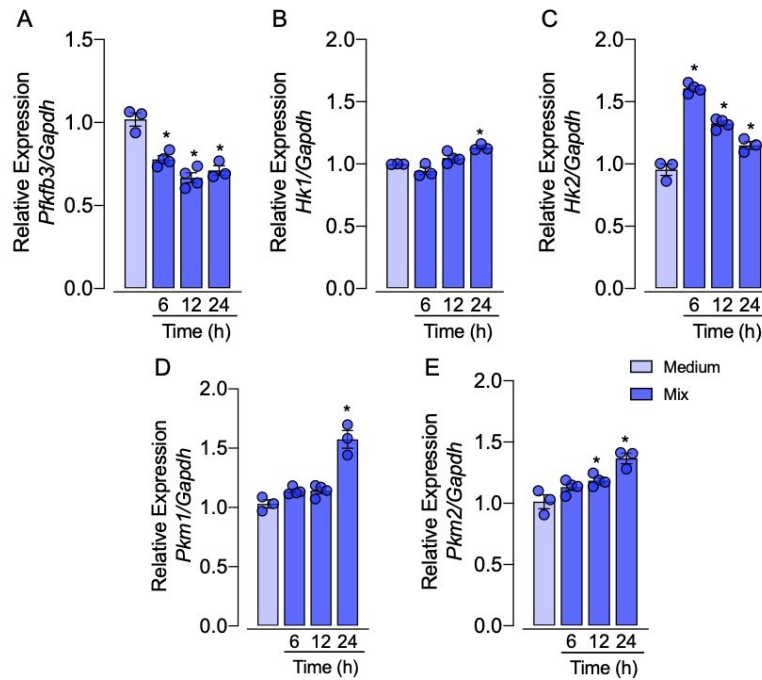


Figura 7. A ativação dos astrócitos por TNF, IL-1 α e C1q altera a expressão de enzimas da via glicolítica. Cultura primária de astrócitos estimulada com um conjunto de mediadores inflamatórios (Mix): TNF (10 ng/ml), IL-1 α (3 ng/ml) e C1q (400 ng/ml), por 6 h, 12 h e 24 h. Expressão gênica de (A-E) *Pfkfb3*, *Hk1*, *Hk2*, *Pkm1* e *Pkm2* por RT-qPCR. Os dados são expressos em média \pm E.P.M. * $P < 0,05$ em relação ao meio, analisados por One-way ANOVA seguido de pós-teste Bonferroni. Os dados são representativos de 2 experimentos independentes com resultados similares, sendo cada ponto uma replicata biológica.

Para aprofundarmos nos estudos de reprogramação metabólica, astrócitos enriquecidos em cultura foram estimulados com o mix de mediadores inflamatórios por 24 horas e posteriormente submetidos aos ensaios de estresse glicolítico e mitocondrial, o *Seahorse* (22). Durante os testes de avaliação mitocondrial, observamos que a taxa de fosforilação oxidativa (OCR, medida pelo consumo de oxigênio) se manteve inalterada em astrócitos previamente ativados (Fig. 8A). Por outro lado, a taxa de acidificação extracelular (ECAR), que indiretamente representa a atividade glicolítica das células, foi significativamente comprometida pelos estímulos com TNF, IL-1 α e C1q (Fig. 8B). Neste caso, é importante ressaltar que estas citocinas não prejudicaram a captação de glicose pelas células (Fig. 8C), sugerindo que a baixa atividade glicolítica deve-se a mecanismos intrínsecos da maquinaria metabólica.

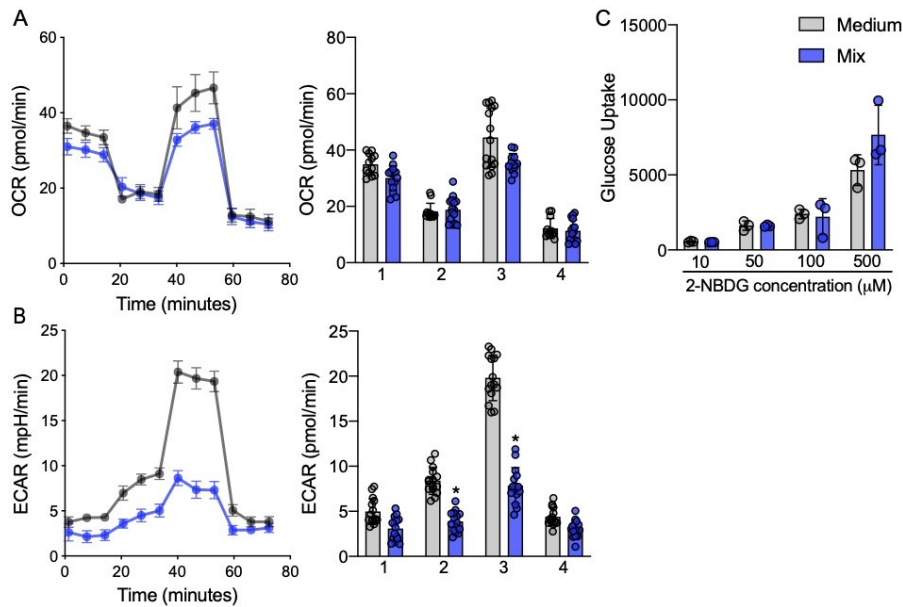


Figura 8. Astrócitos pré-incubados em condições inflamatórias apresentam deficiência da capacidade glicolítica, com a respiração mitocondrial e captação da glicose preservadas. (A) Taxa de fosforilação oxidativa, representada como taxa de consumo de oxigênio (OCR) da cultura primária de astrócitos após 24 h de estímulo com Mix. Para o ensaio: oligomicina 4 μ M, FCCP 3 μ M e Rotenona/Antimicina 3 μ M. **(B)** Taxa de acidificação extracelular (ECAR) durante o teste de estresse glicolítico da cultura primária de astrócitos após 24 h de estímulo com mediadores inflamatórios (Mix): TNF (10 ng/ml), IL-1 α (3 ng/ml) e C1q (400 ng/ml). Para o ensaio: glicose 20 mM, oligomicina 40 μ M e 2-desoxiglicose 80 mM. **(C)** Cultura primária de astrócitos após 24h de estímulo com Mix foram incubadas com 2-NBDG em diferentes concentrações por 1 h. A capacidade de captação de glicose dos astrócitos foi avaliada por citometria de fluxo; MFI, intensidade média de fluorescência. Os dados estão expressos em Média \pm E.P.M. * $P < 0,05$ em relação ao meio, e foram analisados por teste *t Student*. Os dados são representativos de 3 experimentos.

Coletivamente, embora nossos dados indiquem que presença de mediadores inflamatórios induza uma discreta expressão transcricional de enzimas glicolíticas, os resultados funcionais do *Seahorse* sugerem o comprometimento da glicólise aeróbica (conversão de piruvato em lactato) nestes astrócitos. Neste sentido, a indução transcricional de HIK, PKM1/2 e, em especial de HIF-1 α , podem ser interpretadas com uma provável compensação resultante desse déficit metabólico.

4.3 O papel da O-GlcNacilação na resposta inflamatória dos astrócitos *in vitro*.

A via das hexosaminas inicia-se com a conversão da frutose-6-fosfato em glicosamina-6-fosfato pela GFAT1/2 (glutamina frutose-6-fosfato aminotransferase). Seu produto final, o UDP-N-acetilglicosamina, pode então ser adicionado às hidroxilas presentes em serinas e treoninas de proteínas alvo, numa reação conhecida como O-GlcNacilação. A O-GlcNacilação é realizada de maneira reversível pela enzima O-Glicosiltransferase (OGT), podendo ser desfeita pela ação da O-GlcNAcase (OGA) (99).

Para estudarmos a via das hexosaminas, avaliamos, inicialmente, a regulação da transcrição destas três enzimas (GFAT1, OGT e OGA) nas culturas de astrócitos estimuladas com TNF, IL-1 α e C1q. Por qPCR, observamos um modesto aumento na expressão de *Gfpt1* (Fig. 9C), enquanto os transcritos de *Ogt* e *Oga* foram estatisticamente induzidos 24 h após o início das culturas (Fig. 9A-B).

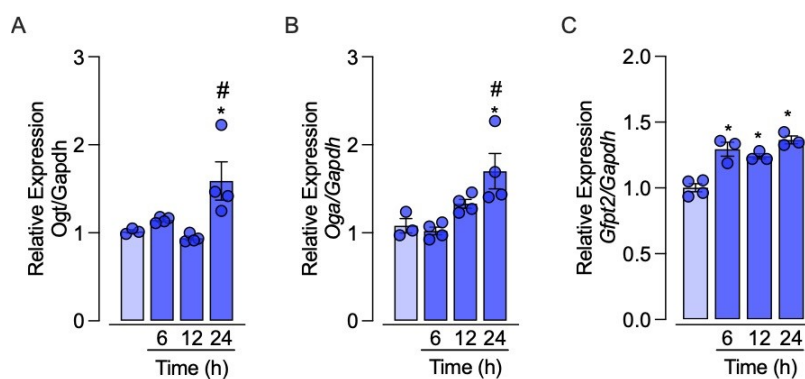


Figura 9. A ativação dos astrócitos por TNF, IL-1 α e C1q induz aumento da expressão de enzimas da via das hexosaminas. Cultura primária de astrócitos estimulada com TNF (10 ng/ml), IL-1 α (3 ng/ml) e C1q (400 ng/ml), por 6 h, 12 h e 24 h. As células coletadas nesse decurso temporal foram submetidas a análise da expressão gênica de *Ogt*, *Oga* e *Gfpt1*. Os dados são expressos em média \pm E.P.M. * $P < 0,05$ em relação ao meio, analisados por One-way ANOVA seguido de pós-teste Bonferroni. Os dados representam 2 experimentos independentes com resultados similares.

Ao avaliarmos a modulação proteica de GFAT-2 e OGT por *Western Blot*, não identificamos diferenças estatisticamente significativas (Fig. 10). Em conjunto, esses dados sugerem que, embora encontramos uma modesta indução de genes da via das hexosaminas após estímulo inflamatório (*Gfpt1*, *Otg* e *Oga*), não observamos a consequente modulação proteica destas enzimas nos períodos avaliados.

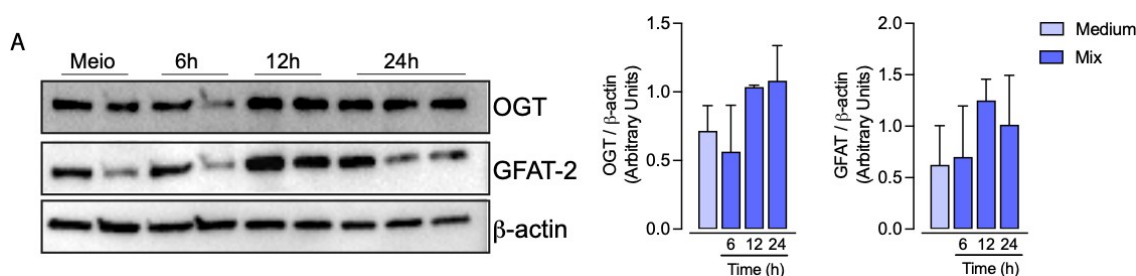


Figura 10. A expressão de GFAT e OGT permanece inalterada frente a estímulos inflamatórios. Cultura primária de astrócitos estimulada com TNF (10 ng/ml), IL-1 α (3 ng/ml) e C1q (400 ng/ml), por 6 h, 12 h e 24 h. (A) As células coletadas nesse decurso temporal foram submetidas a análise da expressão proteica de OGT e GFAT por *Western Blot*. Os dados são representativos de 3 experimentos independentes com resultados similares.

Com o objetivo de complementar os estudos anteriores, investigamos a atividade enzimática da OGT em astrócitos estimulados (nesta bateria de experimentos, utilizamos somente TNF). Através da análise do perfil global de O-GlcNacilação e, conforme

mostrado na Figura 11, não encontramos aparente modulação da atividade catalítica de OGT nesta condições.

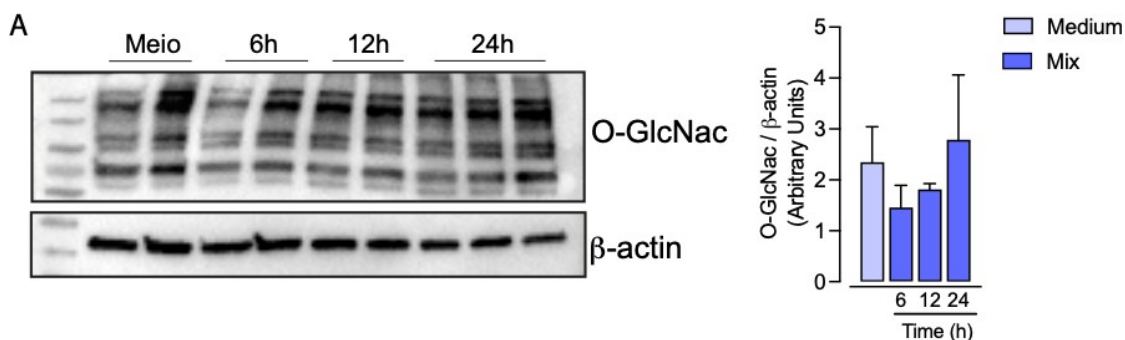


Figura 11. A O-GlcNacilação global permanece inalterada em astrócitos primários estimulados com TNF. Análise da O-GlcNacilação por *Western Blot* em cultura primária de astrócitos estimulados com TNF (10 ng/ml) e coletados após 6 h, 12 h e 24 h. Os dados são representativos de 3 experimentos independentes com resultados similares.

Até o momento, nossos dados sugerem que a resposta inflamatória não altera a expressão (em nível proteico) da principal enzima responsável pela O-GlcNacilação celular. Também não modula sua atividade catalítica global. Mesmo diante desse cenário, não podemos excluir a hipótese na qual a O-GlcNacilação regula as funções efetoras dos astrócitos ativados. É importante ressaltar que os estudos anteriores representam somente o panorama celular da O-GlcNacilação e assim nos impede de identificar modificações pontuais em alvos proteicos específicos que poderiam modificar a resposta inflamatória dos astrócitos. Para a próxima bateria de experimentos, utilizamos estratégias previamente descritas na literatura para modular, farmacologicamente, a O-GlcNacilação dos astrócitos estimulados em cultura.

Por citometria de fluxo, observamos um aumento expressivo da O-GlcNacilação global de astrócitos ativados na presença de Thiamet G, um inibidor seletivo da enzima OGA (Figura 12, à esquerda). Por outro lado, a adição de BADGP (uma droga utilizada para inibir OGT) foi ineficaz em aumentar a O-GlcNacilação em nossas culturas e logo abandonada nos estudos posteriores (Figura 12, à esquerda). Resultados similares foram obtidos por Western blot (Figura 12, à direita).

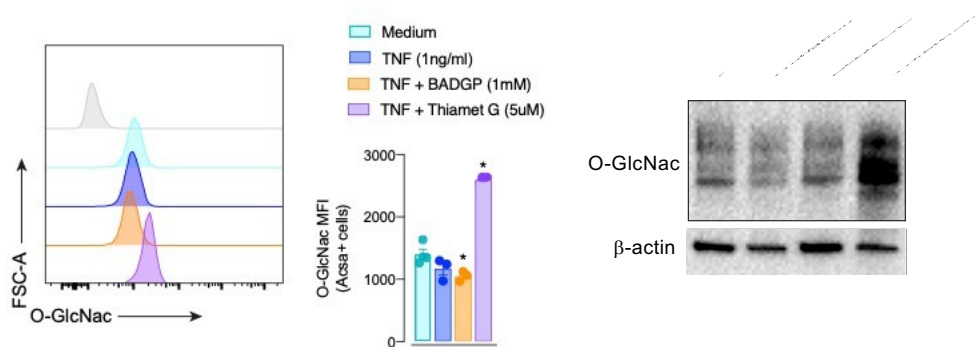


Figura 12. Validação experimental dos inibidores farmacológicos da O-GlcNacilação em cultura de astrócitos. Cultura primária de astrócitos cultivada sob estímulo de TNF (10 ng/ml) na presença de BADGP (1 mM) e Thiamet G (5 uM) por 12 h. (A) O-GlcNacilação avaliada por citometria de fluxo e (B) *Western blot*. Os dados estão expressos em média \pm E.P.M. * $P < 0,05$ em relação ao meio, # $P < 0,05$ em relação ao TNF, One-way ANOVA seguido de pós-teste Bonferroni. Os dados são representativos de 3 experimentos independentes com resultados similares.

Baseados nos resultados anteriores, investigamos se a indução “forçada” da O-GlcNacilação por Thiamet G poderia alterar a maneira com que os astrócitos respondem à estimulação com TNF. Por ELISA, observamos um déficit na promoção de IL-6 e CXCL1 por TNF quando as células estavam super O-GlcNaciladas. CCL2 e CXCL10 permaneceram inalterados (Figura 13).

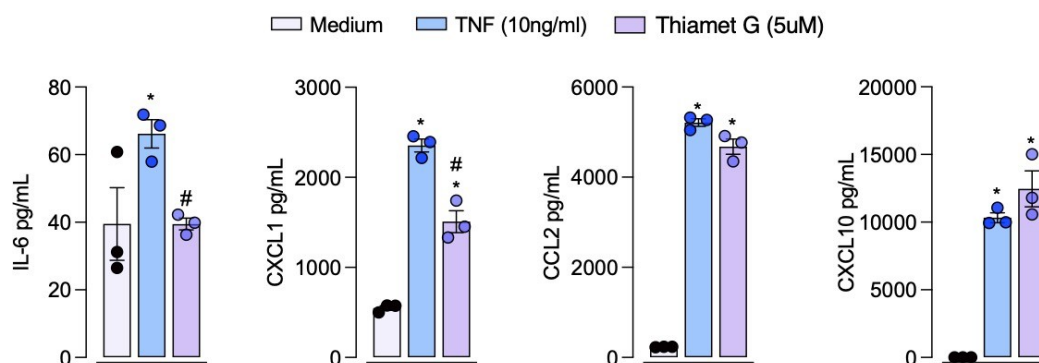


Figura 13. A inibição da OGA altera a produção de citocinas inflamatórias nos astrócitos. Cultura primária de astrócitos cultivada sob estímulo de TNF na presença de Thiamet G por 12h. A produção dos mediadores inflamatórios (IL-6, CCL2, CXCL1 e CXCL10) foi mensurada por ELISA no sobrenadante das culturas estimuladas com TNF (10ng/ml) e Thiamet G (5uM). Os dados estão expressos em Média \pm E.P.M. * $P < 0,05$ em relação ao meio, # $P < 0,05$ em relação ao TNF, e foram analisados por One-way ANOVA seguido de pós-teste Bonferroni. Os dados são representativos de 4 experimentos independentes com resultados similares.

Coletivamente, embora a O-GlcNacilação ocorra por mecanismos não fisiológicos na presença de Thiamet G, nossos dados sugerem (de maneira indireta) uma função anti-inflamatória do UDP-GlcNac nas células. Por o outro, dada a ineficácia farmacológica de BADGP em nossos experimentos, permanece inconclusivo como o

bloqueio da O-GlcNacilação modula as propriedades funcionais dos astrócitos durante a neuroinflamação.

4.4 A avaliação da via das hexosaminas nos astrócitos *in vivo*.

Dados prévios da literatura demonstram que a OGT é altamente expressa no sistema nervoso central. No entanto, são escassas as evidências quanto a sua distribuição celular. Para aprofundarmos nestes tópicos e entendermos como a O-GlcNacilação é regulada *in vivo*, reanalisamos dados públicos de scRNA-Seq (GSE1301119) contendo células do cérebro e medula espinhal de animais C57BL/6 naives. Inicialmente, para representar visualmente a distribuição das diferentes populações, realizamos a redução da dimensionalidade por tSNE (do inglês *t-distributed Stochastic Neighbor Embedding*). Conforme pode ser visualizado na Figura 14, identificamos 14 clusters celulares, sendo três deles anotados como astrócitos (*Astrocytes 1, 2 e 3*). Outras populações identificadas foram micróglia, neurônios, oligodendrócitos, células endoteliais e pericitos.

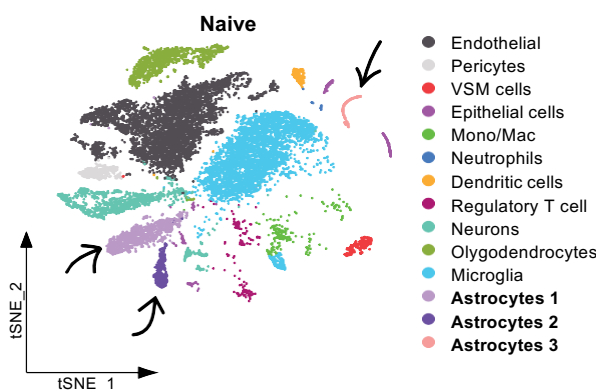


Figura 14. Redução da dimensão utilizando tSNE de células do sistema nervoso central de animais C57BL/6 naives. tSNE *plot* de grupos celulares presentes na medula espinhal de animais naives. Reanálise de dados disponíveis em bancos públicos (GSE1301119). $n = 6$.

A análise da expressão de genes que codificam enzimas da via das hexosaminas demonstrou que a *Ogt* foi expressa em aproximadamente 10% dos astrócitos presente neste *dataset* (Figura 15). Juntamente com os pericitos, os astrócitos 1 foram as células que apresentaram a maior expressão média basal desta enzima. Transcritos para GFAT (*Gfpt1* e *Gfpt2*), PGM3 (*Pgm3*) e UAP (*Uap1*) foram pouco representados (< 5% por cluster). Entretanto, deve-se destacar que *Pgm3* e *Uap1* foram expressos em quantidades expressivas nos astrócitos 3.

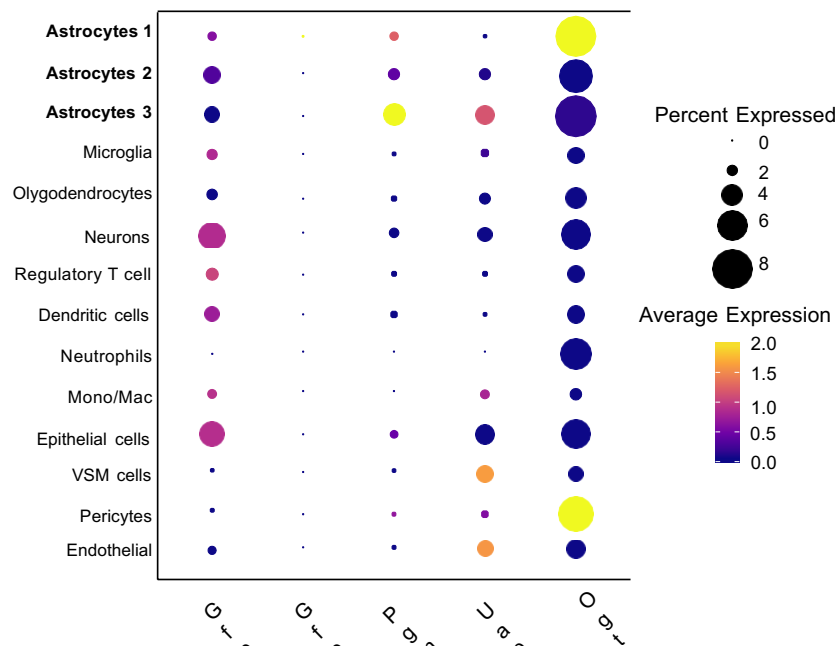
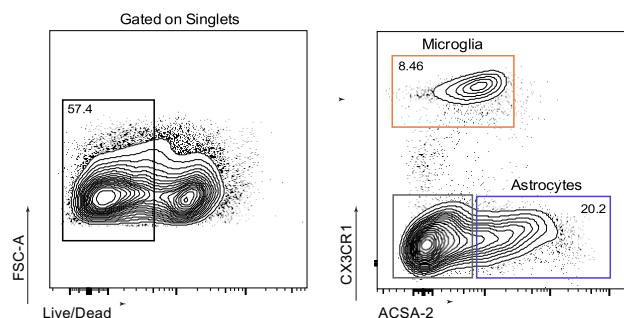


Figura 15. Expressão média basal das enzimas da via das Hexosaminas entre as diferentes populações celulares do SNC de animais naives. O gráfico foi gerado a partir da reanálise de dados disponíveis em bancos públicos (GSE1301119). Animais por grupo $n = 6$ naive.

Para validar esses achados, isolamos astrócitos ($ACSA-2^+$) e micróglia ($CX3CR1^+$) da medula espinhal de animais C57BL/6 adultos por FACS sorting e extraímos o material genético para análise de qPCR. Devido às limitações técnicas que impedem a recuperação de um número expressivo de células (e consequentemente de RNA), verificamos apenas a expressão de *Ogt* e dos marcadores Iba-1 (*Aif1*) e GFAP (*Gfap*). Corroborando com os dados de scRNA-Seq, observamos que transcritos para OGT foram 3 vezes mais representados em astrócitos do que em micróglia (Figura 16). Em conjunto, esses resultados suportam a expressão basal da maquinaria responsável pela O-GlcNacilação no sistema nervoso central adulto, e destaca um papel especial para os astrócitos.



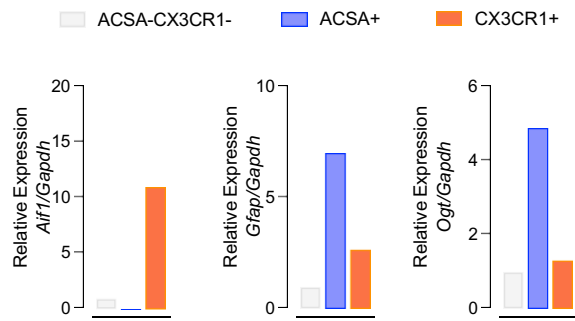


Figura 16. A expressão da OGT é maior em astrócitos do que em micróglia sob condições homeostáticas. Estratégia de *gate* utilizada para isolamento das populações celulares por FACS sorting. Expressão de *Aif1*, *Gfap* e *Ogt* em populações ACSA⁻CX3CR1⁻, ACSA⁺, e CX3CR1⁺ isoladas da medula espinhal de animais C57BL/6 naives.

4.5 Avaliação da via das hexosaminas durante a neuroinflamação.

A partir dos dados obtidos, decidimos investigar se o processo inflamatório modula a O-GlcNacilação nos astrócitos *in vivo*. Para tal finalidade, escolhemos como modelo de neuroinflamação a encefalomielite autoimune experimental (EAE). Através da mesma abordagem adotada anteriormente, reanalisamos dados públicos de scRNA-Seq incluindo amostras de animais com EAE durante três fases distintas: (1) *priming*; (2) *peak* e (3) *remission*. Os resultados mostram que, com o curso da doença, existe uma maior representação de clusters contendo células T e monócitos (Figura 18). Os astrócitos, porém, sofrem uma leve redução durante o pico da resposta inflamatória e retornam aos níveis basais durante a fase de remissão.

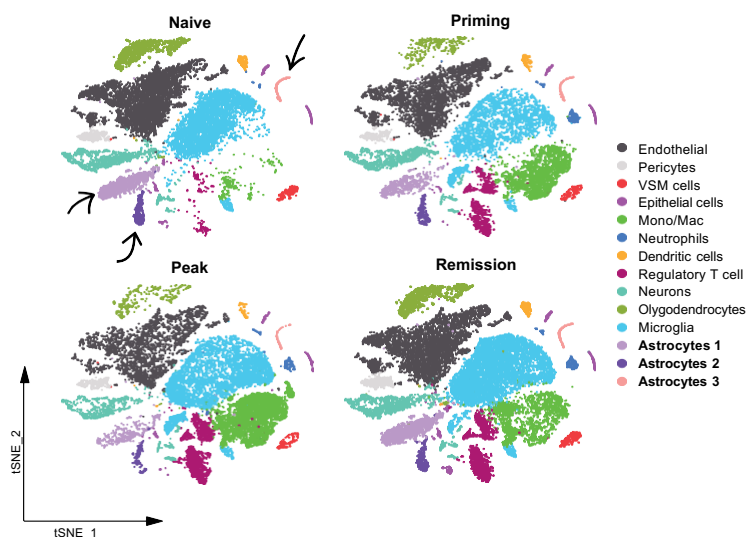


Figura 17. Diferentes populações celulares compõem o SNC de animais induzidos com EAE. tSNE plot de grupos celulares presentes na medula espinhal de animais nos quais foi induzida EAE. Reanálise de dados disponíveis em bancos públicos (GSE1301119). Animais por grupo $n = 6$ *naive*, $n = 4$ *priming*, $n = 6$ *peak*, $n = 6$ *remission*.

Nestas condições, também encontramos uma interessante modulação da OGT em distintos subtipos celulares (Figura 18). Sua expressão basal em populações de pericitos foi substancialmente desligada e houve uma indução transiente de OGT por células epiteliais durante o *priming* da doença. Dentre as populações astrocíticas, atenção especial deve ser dada ao cluster número 3. Nestas células, *Ogt* foi significativamente up-regulada no pico inflamatório do modelo e manteve-se altamente expressa durante a fase de remissão, em níveis bastante similares aos encontrados nos astrócitos 1 (Figura 18). Esses resultados sugerem uma potencial relação entre a resposta inflamatória e a O-GlcNacilação em populações de astrócitos, particularmente representadas pelo cluster 3 deste *dataset*.

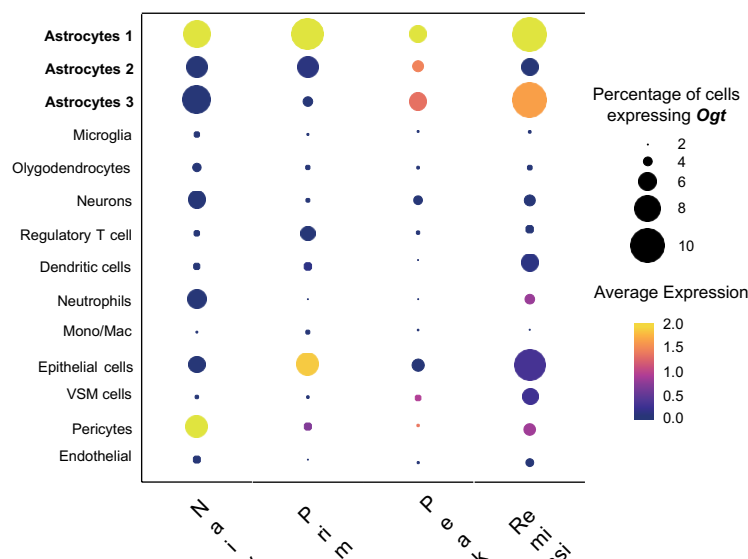


Figura 18. A expressão da enzima OGT se altera entre as subpopulações de astrócitos durante o curso da EAE. Perfil de expressão da enzima OGT entre as diferentes populações celulares do SNC em condições naive e durante as fases de *priming*, *peak* e *remission* da EAE. O gráfico foi gerado a partir da reanálise de dados disponíveis em bancos públicos (GSE1301119). Animais por grupo $n = 6$ naive, $n = 4$ *priming*, $n = 6$ *peak*, $n = 6$ *remission*.

4.6 Investigação do papel da OGT nos astrócitos durante o desenvolvimento da EAE

Após o estabelecimento da regulação temporal de OGT nas diferentes fases do EAE, buscamos avaliar sua relevância funcional para o curso da doença. Para tal finalidade, estabelecemos colônia de animais deficientes para OGT especificamente em astrócitos. Atualmente, os melhores (e mais específicos) resultados são obtidos pela expressão da enzima *Cre recombinase* sob controle do promotor do gene *Aldh1l1* (do inglês *Aldehyde Dehydrogenase 1 Family Member L1*). Assim, o cruzamento de animais *Aldh1l1*^{CreER} com a linhagem na qual OGT flanqueada por sequências LoxP (*Ogt*^{fl/fl}) resultou na geração dos OGT-deficientes em astrócitos (*Aldh1l1*^{CreER}/*Ogt*^{fl/fl}).

Para a validação da expressão de Cre nos animais *Aldh111*^{CreER}, também geramos animais *Aldh111*^{CreER/R26}^{TdTomato}. Neste sistema, o tratamento sistêmico com tamoxifeno induz TdTomato especificamente nas células em que a *Cre* se tornou expressa. Duas semanas após as injeções de tamoxifeno, por imunofluorescência, observamos que somente os astrócitos da medula espinhal expressavam TdTomato (Figura 19). Esses resultados suportaram uma eficiente recombinação da *Cre* na linhagem *Aldh111*^{CreER} e guiaram os experimentos posteriores de deleção astrocítica de OGT.

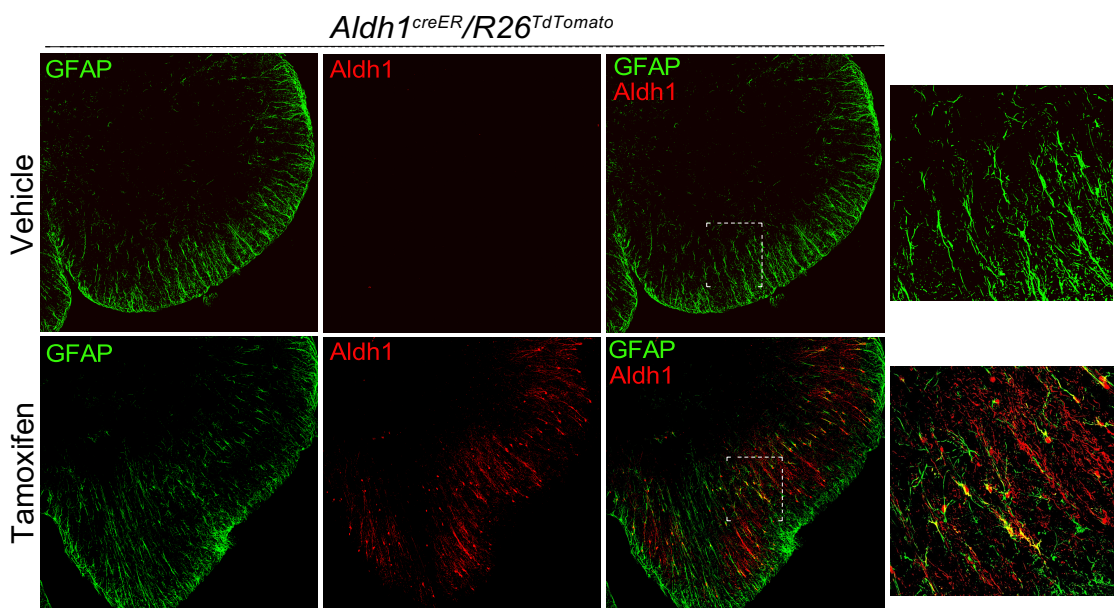


Figura 19. O tratamento com tamoxifeno induz recombinação da enzima *Cre recombinase* em astrócitos da medula espinhal. Animais *Aldh111*^{creER/R26}^{TdTomato} foram tratados via intraperitoneal com tamoxifeno (75mg/kg) por 5 dias consecutivos. Após 14 dias, a medula espinhal desses animais foi coletada para o ensaio de imunofluorescência. Astrócitos GFAP-GFP⁺ estão representados em verde e as células Aldh111-TdTomato⁺ representadas em vermelho.

Repetindo o mesmo protocolo padronizado nos experimentos anteriores, astrócitos (ACSA-2⁺) e micróglias (CD45^{int}CD11b⁺) foram obtidos por FACS sorting da medula espinhal de animais *Aldh111*^{creER/Ogt}^{fl/fl} (ou *Ogt*^{fl/fl}) coletada duas semanas após a última dose de tamoxifeno. Suportando uma recombinação de *Cre* eficiente e específica, a expressão de *Ogt* foi virtualmente ausente em astrócitos isolados dos animais *Aldh111*^{creER/Ogt}^{fl/fl} quando comparados aos *Ogt*^{fl/fl} (Figura 20).

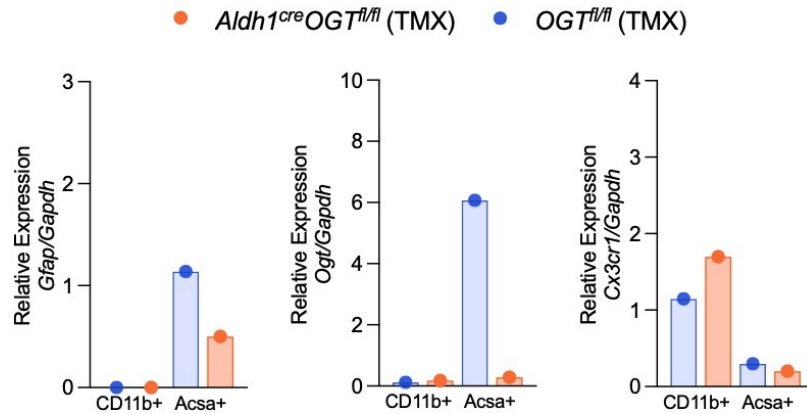


Figura 20. A expressão da OGT é virtualmente ausente em astrócitos da medula espinhal de animais *Aldh111^{creER}/Ogt^{fl/fl}* tratados com tamoxifeno. Análise de qPCR dos genes *Gfap*, *Ogt* e *Cx3cr1* relativo à expressão de *Gapdh* em células ACSA-2⁺ e CD11b⁺ isoladas da medula espinhal de animais *Aldh111^{creER}/Ogt^{fl/fl}* ou *Ogt^{fl/fl}* tratados com tamoxifeno (TMX; 75mg/kg i.p.).

Após estas validações, iniciamos uma série de estudos com EAE. Em um primeiro momento, três grupos foram imunizados com MOG₃₅₋₅₅ duas semanas após receberem a última dose de tamoxifeno/veículo – (1) *Aldh111^{creER}/Ogt^{fl/fl}* tratados com tamoxifeno; (2) *Aldh111^{creER}/Ogt^{fl/fl}* tratados com veículo e (3) *Ogt^{fl/fl}* tratados com tamoxifeno. Similarmente aos experimentos de rotina realizados em nosso laboratório, animais *Aldh111^{creER}/Ogt^{fl/fl}* tratados com veículo (OGT-suficientes) desenvolveram os primeiros sinais clínicos do EAE por volta do décimo dia após a imunização, com pico ocorrendo entre os dias 15-20 (Figura 21, à esquerda). Por outro lado, o curso da doença foi significativamente alterado em ambos os grupos tratados com tamoxifeno. Animais *Ogt^{fl/fl}* (OGT-suficientes) desenvolveram EAE com um retardo de quase dez dias, enquanto os *Aldh111^{creER}/Ogt^{fl/fl}* (OGT-deficientes) sequer ficaram doentes (Figura 21, à esquerda). Esses resultados sugerem que o regime de tratamento com tamoxifeno utilizado nesses experimentos alterou a progressão natural da doença e dessa forma a interpretação dos dados se torna inviável.

Existem diversas evidências de como o tamoxifeno interfere no desenvolvimento do EAE, seja por suprimir a proliferação de células T específicas para a mielina ou reduzir a indução de MHC II por células dendríticas estimuladas com LPS (131). Diante dos resultados anteriores, decidimos pela ampliação do intervalo entre a última dose de tamoxifeno e o início da imunização com MOG₃₅₋₅₅ (de duas para cinco semanas). Nesse segundo momento, o desenvolvimento do EAE foi comparado somente entre dois grupos tratados com tamoxifeno – (1) *Aldh111^{creER}/Ogt^{fl/fl}* e (2) *Ogt^{fl/fl}*. Dessa vez, embora o início dos sinais clínicos tenha ocorrido dentro da janela esperada e de maneira similar entre os

dois genótipos, os animais OGT-deficientes (*Aldh111^{creER/Ogt^{fl/fl}}*) tiveram uma redução significativa no score clínico da doença quando comparados seus controles (*Ogt^{fl/fl}*, OGT-suficientes) (Figura 21, à direita).

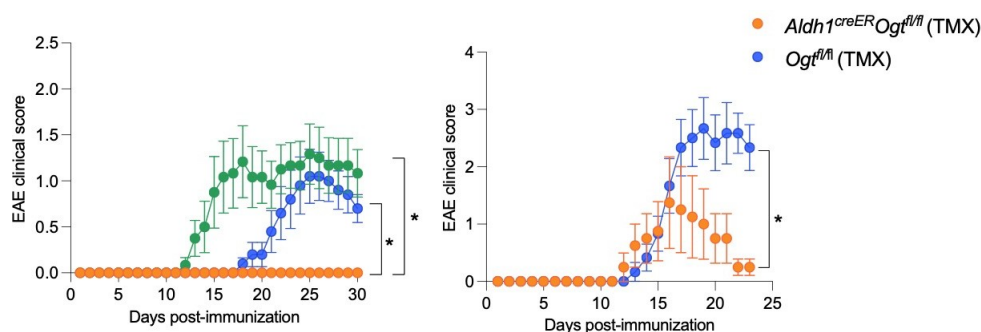


Figura 21. A expressão da OGT nos astrócitos promove o desenvolvimento da EAE. Sinais clínicos de animais submetidos à indução de EAE. Fêmeas adultas (10-15 semanas) *Ogt^{fl/fl}* e *Aldh111^{creER/Ogt^{fl/fl}}* foram tratadas com tamoxifeno ou veículo (TMX; 75mg/kg i.p.) e posteriormente imunizadas com MOG₃₅₋₅₅ (n = 6). O intervalo entre a administração da última dose de TMX e a imunização foi de (A) duas ou de (B) cinco semanas. Dados expressos em média ± E.P.M. * $P < 0,05$, analisados através da ANOVA de duas vias seguido de pós-teste Bonferroni. Os dados são representativos de 5 experimentos independentes com resultados similares.

Visto que o EAE é um modelo experimental no qual células T reconhecem antígenos presentes na bainha de mielina, avaliamos o status de mielinização das medulas obtidas desses, como um indicador funcional da doença. Conforme demonstrado na Figura 22, nota-se uma maior preservação da mielina nos animais *Aldh111^{creER/Ogt^{fl/fl}}*, com menor expressão gênica e proteica de GFAP (Figura 22). De maneira bastante elegante, esses resultados refletem uma progressão mais branda do EAE em animais OGT-deficientes e sugerem menor ativação dos astrócitos incapazes de realizar a O-GlcNacilação.

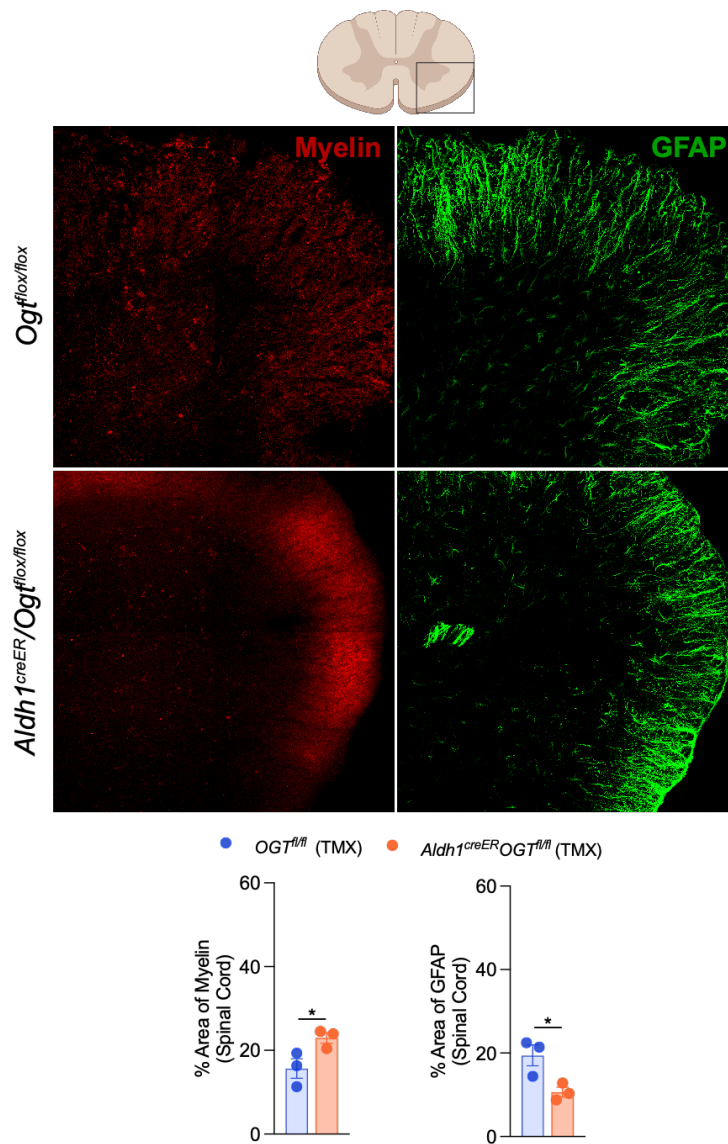


Figura 22. A ausência da OGT em astrócitos altera o padrão de distribuição da mielina e dos astrócitos durante a EAE. Animais *Aldh111^{creER}/Ogt^{fl/fl}* e *Ogt^{fl/fl}* foram previamente tratados com tamoxifeno (TMX; 75mg/kg i.p.), e em seguida imunizados com 300µg de MOG₃₅₋₅₅ para indução do modelo de EAE (n=6). O score clínico foi avaliado. A medula espinhal dos animais foi coletada para análise da expressão de mielina (vermelho – myelin) e de astrócitos (verde – GFAP) por imunofluorescência. Os dados estão expressos em Média ±E.P.M. *P<0,05 em relação ao WT, e foram analisados por teste *t Student*.

Em casos específicos, a expressão forçada da enzima *Cre* pode alterar a fisiologia natural das células e assim mascarar a interpretação dos resultados (132). Para excluir a possibilidade de que o fenótipo anterior tenha ocorrido pela presença da *Cre* em astrócitos (ou pela inserção do cromossomo bacteriano artificial utilizado na construção), realizamos uma rodada adicional de experimentos. Neste sentido, animais hemizigotos *Aldh111^{creER}* e seus respectivos *littermates* (*Aldh111^{neg}*) foram tratados com tamoxifeno e posteriormente imunizados com MOG₃₅₋₅₅ para indução da EAE. Conforme demonstrado

na Figura 23, não observamos qualquer diferença na cinética de desenvolvimento da doença entre animais carreadores não-carreadores de *Cre*. Em conjunto, esses resultados sugerem que a expressão da OGT em astrócitos (e/ou sua atividade canônica – a O-GlcNacilação) possui papel deletério na progressão da encefalomielite autoimune experimental.

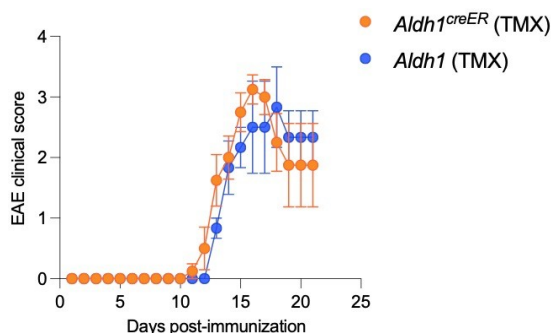


Figura 23. A expressão da enzima *Cre recombinase* não altera o fenótipo da EAE. Animais *Aldh111^{creER}* e *Aldh111* foram previamente tratados com tamoxifeno (TMX; 75mg/kg i.p.) e, em seguida, imunizados com MOG₃₅₋₅₅ (300ug) para indução da EAE (n=6). O score clínico foi avaliado até o dia 24.

Frente aos fenótipos observados, decidimos investigar se (e como) a ausência de OGT em astrócitos poderia prejudicar a resposta imunológica montada durante o desenvolvimento de EAE. Neste modelo, células T anti-mielina são geradas periféricamente nos linfonodos drenantes de animais imunizados com MOG₃₅₋₅₅. Sete dias mais tarde, estes mesmos linfócitos alcançam o sistema nervoso central e iniciam os eventos de neuroinflamação através da liberação de citocinas pró-inflamatórias (IL-17A, IFN γ e GM-CSF). Inicialmente, analisamos por citometria de fluxo a distribuição das células T após o aparecimento dos primeiros sinais clínicos da doença em animais OGT-deficientes ou suficientes – *Aldh111^{creER}/Ogt^{fl/fl}* e *Ogt^{fl/fl}* respectivamente. Nenhuma diferença significativa foi observada quando comparamos a proporção (%) ou número absoluto de células T CD4⁺, Th17 e Treg nos linfonodos inguinais (Figura 24, acima) e medula espinhal (Figura 24, abaixo) desses animais. Esses achados descartam uma relação entre o fenótipo descrito anteriormente e um déficit na formação da resposta imune periférica.

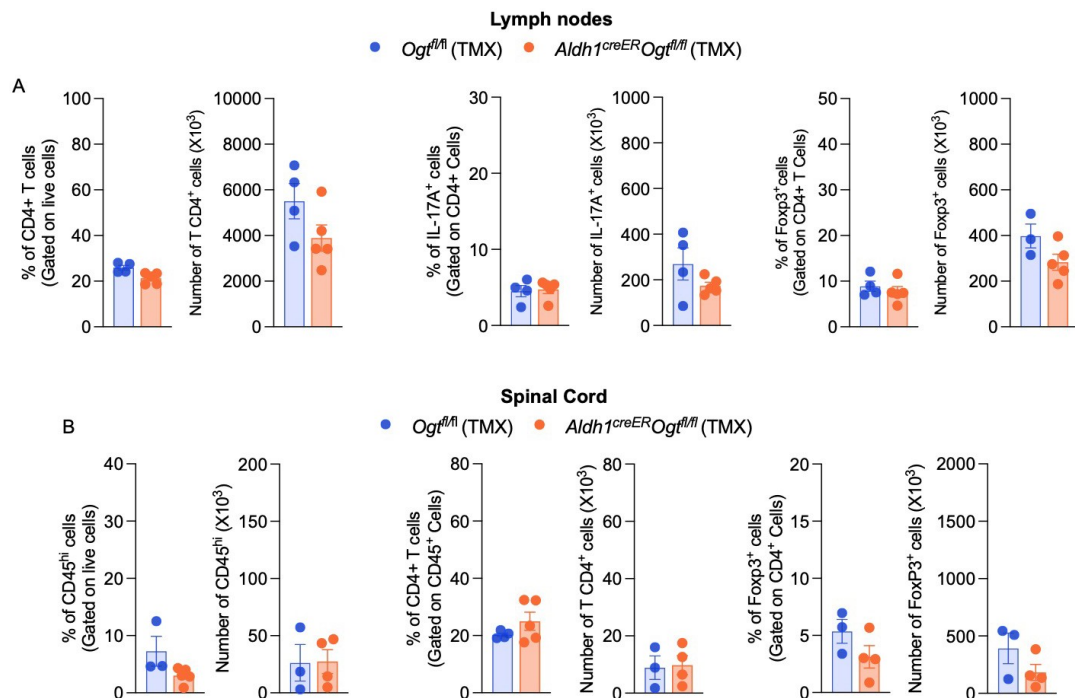


Figura 24. A melhora no score clínico não se correlaciona com a resposta imune periférica. *Aldh111^{creER}/Ogt^{fl/fl}* foram previamente tratados com tamoxifeno (TMX; 75mg/kg i.p.), e em seguida imunizados com 300µg de MOG₃₅₋₅₅ para indução do modelo de EAE (n=6). O score clínico foi avaliado até o dia 15. (A-B) Proporção (%) e número de células T CD4⁺, IL-17⁺ e Foxp3⁺ derivadas de linfonodos inguinais e medula espinhal de animais *knockout* e controle, analisados por citometria de fluxo. Os dados são representativos de 2 experimentos independentes com resultados similares.

Posteriormente, avaliamos a função efetora dos linfócitos anti-mielina gerados periféricamente nos animais OGT-suficientes e deficientes. Para estes experimentos, células obtidas dos linfonodos drenantes de animais com EAE (entre os dias 10-12 após a imunização) foram reestimuladas com MOG₃₅₋₅₅ e a secreção de citocinas foi avaliada por ELISA. Conforme mostrado na Figura 25 não observamos alterações estatisticamente significativas nas concentrações de GM-CSF, IL-10 e IFN γ . Coletivamente, esses achados demonstram que a expressão de OGT (ou a GlcNacilação) em astrócitos não prejudica a geração da resposta imune periférica anti-MOG₃₅₋₅₅.

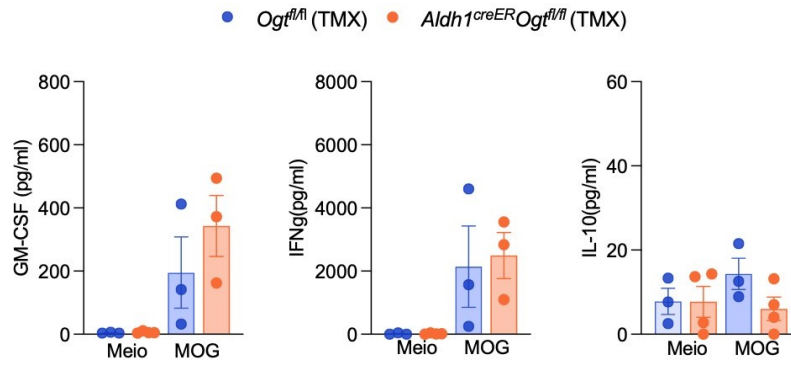


Figura 25. A ausência da OGT em astrócitos não afeta a resposta antígeno-específica das células T durante o desenvolvimento da EAE. Animais *Aldh111^{creER}/Ogt^{fl/fl}* e *Ogt^{fl/fl}* foram previamente tratados com tamoxifeno (TMX; 75mg/kg i.p.), e em seguida imunizados com 300µg de MOG₃₅₋₅₅ para indução do modelo de EAE (n = 6). O score clínico foi avaliado. No pico da doença os linfonodos foram coletados e as células T isoladas para posterior estímulo in vitro. Os mediadores produzidos em cultura GM-CSF, IFN, IL-10, foram mensurados por ELISA.

Durante o curso do EAE, células T primadas nos linfonodos drenantes tornam-se efetoras, aumentam em número e, através da aquisição de receptores de quimiocinas e moléculas de adesão, invadem o parênquima cerebral e medular dos animais. Os resultados anteriores descartaram a hipótese de que alterações imunes periféricas são as responsáveis pelo desenvolvimento mais brando de EAE nos animais OGT-deficientes. Assim, nesta próxima bateria de experimentos, repetimos os protocolos de imunização e avaliamos a resposta inflamatória parenquimal durante o pico da doença (entre os dias 15 e 18 após a imunização). Por citometria de fluxo, observamos que a população de leucócitos infiltrantes (células CD45^{hi}) reduziu significativamente nos animais *Aldh111^{creER}/Ogt^{fl/fl}* (não mostrado). Dentre os subtipos de leucócitos, as células T CD4⁺ estiveram menos representadas em amostras de medula obtidas dos animais OGT-deficientes em comparação aos OGT-suficientes. Por outro lado, encontramos um modesto, porém significativo, aumento das células T reguladoras. A frequência e número absoluto dos linfócitos Th17 foram equivalentes entre os grupos (Figura 26).

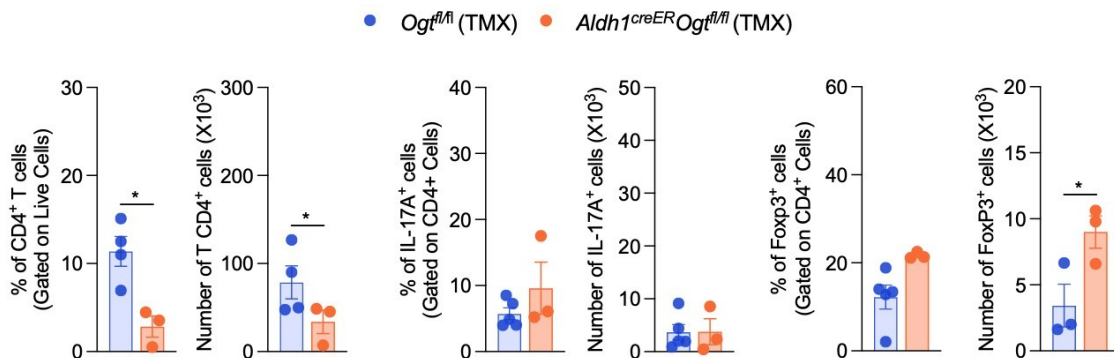


Figura 26. A melhora no score clínico se correlaciona com a redução na resposta inflamatória no SNC. *Aldh111^{creER}/Ogt^{fl/fl}* foram previamente tratados com tamoxifeno (TMX; 75mg/kg i.p.), e em seguida imunizados com 300µg de MOG₃₅₋₅₅ para indução do modelo de EAE (n = 6). O score clínico foi avaliado. Proporção (%) e número de células T CD4⁺, IL-17A⁺ e Foxp3⁺ presentes na medula espinhal foram avaliados por citometria de fluxo. Os dados estão expressos em média ±E.P.M. **P* < 0,05 em relação ao WT, e foram analisados por teste *t Student*.

Similarmente, a análise adicional de outras populações na medula espinhal desses animais revelou diferenças relevantes na resposta inflamatória local. Células dendríticas maduras (Ly6G⁻CD11b⁻CCR2⁻Ly6C⁻CD11c⁺), derivadas de monócitos (MoDC; Ly6G⁻CD11b⁺CCR2⁺Ly6C⁺ CD11c⁺), macrófagos (Ly6G⁻CD11c⁻CCR2⁻Ly6C⁻CD11b⁺) e micróglias (CD45^{int}CD11b⁺) foram todos sub-representados, em números absolutos, nos animais *Aldh111^{creER}:Ogt^{fl/fl}* (Figura 27). Monócitos inflamatórios (Ly6G⁻CD11c⁻CD11b⁺CCR2⁺Ly6C⁺), por sua vez, apareceram de maneira equivalente entre os dois grupos (Figura 27). De maneira coletiva, esses dados refletem as alterações clínicas observadas durante a progressão do EAE em animais OGT-deficientes e fornecem pistas interessantes a respeito dos possíveis mecanismos adjacentes.

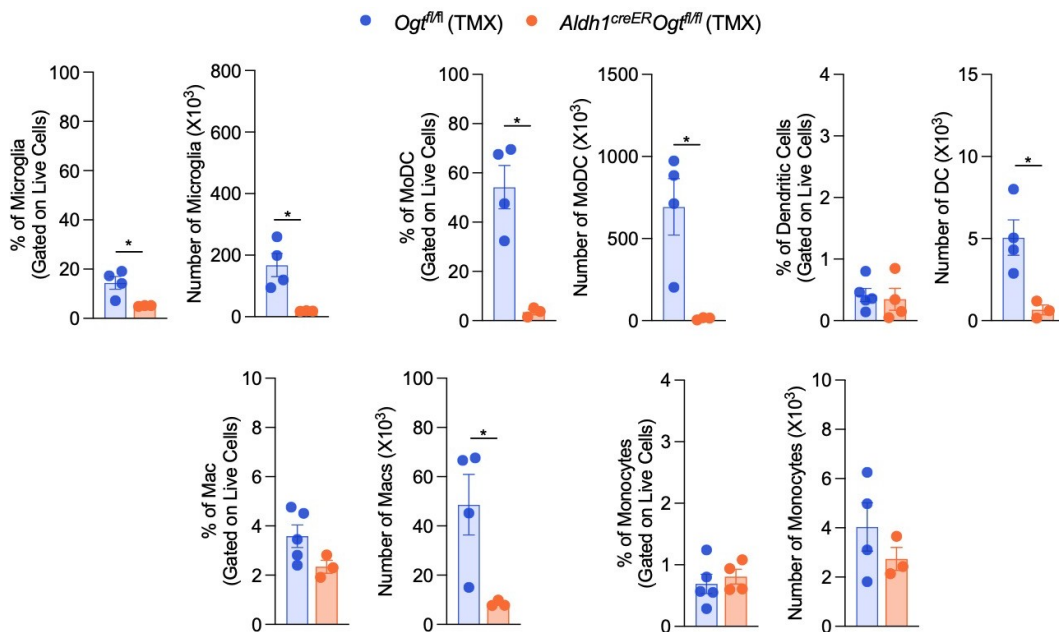


Figura 27. A melhora no score clínico se correlaciona com uma redução na resposta imune central. Animais *Aldh111^{creER}/Ogt^{fl/fl}* e *Ogt^{fl/fl}* foram previamente tratados com tamoxifeno (TMX; 75mg/kg i.p.), e em seguida imunizados com 300µg de MOG₃₅₋₅₅ para indução do modelo de EAE (n = 6). O score clínico foi avaliado. Proporção (%) e o número de microglia, MoDC (células dendríticas derivadas de monócitos), células dendríticas maduras, macrófagos e monócitos inflamatórios presentes na medula espinhal foram avaliados por citometria de fluxo. Os dados estão expressos em média ±E.P.M. **P* < 0,05 em relação ao WT, e foram analisados por teste *t Student*.

5. Discussão

Dados da literatura descrevem vários mecanismos pelos quais os astrócitos reconhecem estímulos nocivos e participam do controle da homeostasia (1,6). Frente aos mais diversos estressores, os astrócitos reativos, como são atualmente chamados, sofrem um significativo remodelamento funcional, com mudanças morfológicas, moleculares e metabólicas. Apesar dos recentes avanços na área, permanece desconhecido como essas alterações metabólicas se encaixam no contexto das doenças neurológicas.

Através da utilização de ferramentas genéticas e farmacológicas, estudos *in vitro* e *in vivo*, investigamos como a neuroinflamação regula a O-GlcNacilação dos astrócitos, uma modificação pós-traducional resultante do metabolismo da glicose. Em resumo, embora a capacidade glicolítica de astrócitos cultivados sob condições inflamatórias tenha sido comprometida, não observamos alterações na expressão da enzima OGT e nem no padrão de O-GlcNacilação global celular. Funcionalmente, a indução farmacológica (não específica) da O-GlcNacilação desencadeou funções anti-inflamatórias. Por outro lado, nos estudos utilizando o modelo da encefalomielite autoimune experimental (EAE), a deleção específica de OGT nos astrócitos aliviou significativamente a progressão da doença e foi acompanhada por um menor infiltrado de células imunes no parênquima medular. Mesmo que ainda preliminares, nossos dados suportam a hipótese de que a O-GlcNacilação em alvos (ainda) desconhecidos em astrócitos possui papel deletério na neuroinflamação.

Iniciamos nosso trabalho com a padronização da cultura primária de astrócitos. Neste sistema, validamos dados prévios da literatura nos quais estímulos inflamatórios induzem a liberação de moléculas tradicionalmente associadas a ativação celular – IL-6, CCL2, CXCL1 e CXCL10 (125). Três estímulos foram utilizados e obtivemos resultados similares: TNF, LPS e a combinação de TNF, IL-1 α e C1q (9).

Os astrócitos são células metabolicamente ativas e utilizam a glicose como principal substrato para a geração de energia (34,41). Na glicólise, o piruvato formado a pode gerar tanto lactato quanto ser convertido em Acetil-CoA pela ação da enzima PDH. Observamos que, sob condições inflamatórias, os astrócitos não alteram a transcrição do principal regulador negativo de PDH, a PDK1, porém induziram HIF-1 α .

Diversos trabalhos sugerem que a resposta inflamatória induz aumento da expressão de GLUT-1, como forma de suprir a alta demanda metabólica nesse contexto (15-16).

Nos astrócitos cultivados em nossas condições inflamatórias, encontramos uma redução a expressão de GLUT-1. Esta diferença talvez seja explicada pelo predominante armazenamento da glicose em forma de glicogênio nestas células que, em situações específicas, pode ser rapidamente mobilizada como fonte de energia (17-19).

Em seguida, checamos se a inflamação poderia modular a glicólise através da transcrição de enzimas adicionais da via. Neste caso, encontramos um aumento na expressão de *Hk1*, *Pkm1* e *Pkm2*, especialmente 24 h após os estímulos inflamatórios. *Hk2* apresentou um pico agudo de expressão, logo após as primeiras 6 h e decaiu nos períodos posteriores. Estes resultados poderiam indicar um *feedback* positivo da via pelo acúmulo dos metabólitos *upstream*. O aumento de *Pkm1* e de *Pkm2* corrobora com dados prévios da literatura em modelos de carcinoma e na neuroinflamação (20-21). Por outro lado, o gene que codifica a PFKB3 foi suprimido. Esta enzima tem como substrato a frutose-6-fosfato (F6P), o primeiro intermediário comum das vias glicolíticas e das Hexosaminas.

Procuramos nos aprofundar nos estudos de reprogramação metabólica e realizamos experimentos funcionais utilizando o *Seahorse* (22). Não houve diferenças significativas na taxa de fosforilação oxidativa (OXPHOS) dos astrócitos frente a estímulos inflamatórios. Entretanto, destaca-se à menor capacidade glicolítica (ECAR) nestas condições. Fisiologicamente, a glicólise aeróbica representa a principal via de obtenção de energia dos astrócitos (34) e assim, esses dados sugerem a reprogramação metabólica em condições inflamatórias. Dentre as possibilidades, trabalhos recentes demonstram que em condições não fisiológicas, os astrócitos são capazes de metabolizar eficientemente o excesso de ácidos graxos e preservar a capacidade funcional de neurônios (133).

Posteriormente, investigamos se esse *shift* metabólico poderia resultar no favorecimento da via das hexosaminas (VH) e, conseqüentemente, na maior O-GlcNAcilação. Em condições fisiológicas, estudos sugerem que de 2 a 3% da glicose celular é desviada para a VH (98). Conforme mencionado anteriormente, a VH inicia-se com a utilização da F6P pela enzima GFAT1/2 e a formação do GlcN6P. No final da via, as reações de O-GlcNAcilação é realizada pelas enzimas OGT e OGA. Em nossos experimentos, astrócitos estimulados em cultura apresentaram maior transcrição dos genes que codificam a OGT, OGA e GFAT1. Porém, esses achados não foram corroborados pela análise de seus respectivos níveis proteicos. O perfil de O-GlcNAcilação das células também se manteve constante durante os períodos avaliados,

sugerindo que os mediadores inflamatórios utilizados nesses estudos não interferem com a O-GlcNAcilação dos astrócitos.

Infelizmente, por questões técnicas, não pudemos endereçar como a ausência da O-GlcNAcilação nestas culturas afetava a produção das quimiocinas e citocinas mensuradas. As drogas atualmente disponíveis no mercado não entregam a especificidade desejada e a presença do BADGP não alterou a O-GlcNAcilação em nossas culturas. Por outro lado, a inibição farmacológica da OGA comprometeu a promoção das citocinas IL-6 e CXCL1 frente aos estímulos inflamatórios. Em conjunto, estes resultados indicam que O-GlcNAcilação pode regular vias anti-inflamatórias específicas em astrócitos. Em macrófagos, a estimulação com LPS induz a expressão de GFAT-1 e o consequente aumento da O-GlcNAcilação de proteínas. Similarmente, a indução da O-GlcNAcilação nessas culturas foi correlacionada a uma resposta anti-inflamatória (134).

Em seguida, investigamos como (e quanto) os resultados anteriores poderiam ser extrapolados para as condições inflamatórias observadas *in vivo*. Para essa finalidade, reanalisamos dados públicos de scRNA-Seq contendo amostras obtidas do sistema nervoso central de animais submetidos ao EAE. Neste *dataset*, observamos uma modesta expressão de transcritos envolvidos na VH (*Gfpt1*, *Gfpt2*, *Pgm3* e *Uap1*). No entanto, a enzima OGT foi altamente expressa no cluster 1 de astrócitos e em pericitos de camundongos naive. Esses resultados foram validados em células ACSA-2⁺ isoladas em nosso laboratório e suportaram a expressão preferencial de *Ogt* em astrócitos no sistema nervoso central.

Quando a regulação de OGT foi avaliada de maneira temporal no curso do EAE, destacamos um grupo de astrócitos contidos, especificamente, no cluster 3 do scRNA-Seq. Diferentemente dos pericitos que down-regularam *Ogt* e dos astrócitos 1 que mantiveram seus níveis de expressão basal, os astrócitos 3 aumentaram a transcrição de OGT durante o período mais inflamatório da doença. Infelizmente, não tivemos tempo de aprofundar nossas análises e conhecer detalhes adicionais sobre as vias transcricionais específicas que diferenciam essa subpopulação de astrócitos das demais. Sabe-se que os astrócitos compreendem populações heterogêneas quanto à localização, morfologia e propriedades funcionais (10, 37, 135).

Nos experimentos finais, avaliamos a contribuição funcional da expressão de OGT (e logo da O-GlcNAcilação) em astrócitos para o desenvolvimento do EAE. Para isso, geramos e validamos animais nos quais a OGT foi condicionalmente deletada dos astrócitos, os *Aldh1l1*^{creER}/*Ogt*^{fl/fl}. Nossos resultados demonstraram que os animais OGT-

deficientes foram menos suscetíveis ao desenvolvimento dos sinais clínicos da doença, o que sugere um papel pro-inflamatório da O-GlcNAcilação nestas células. Novamente vale destacar a necessidade de se analisar a fundo as características transcricionais dos astrócitos contidos no cluster 3, pois estes podem ser os responsáveis pela promoção da resposta inflamatória presente no EAE.

Muito esforço tem sido dedicado para o entendimento dos mecanismos causais do início e progressão das respostas inflamatórias que acometem o sistema nervoso central. Embora não exista dúvidas de que os principais efetores no EAE sejam as células recrutadas do sangue, diversas evidências apontam um papel crucial das populações residentes (astrócitos e micróglia) no recrutamento, ativação e retenção desses leucócitos. Conforme esperado, nossos dados demonstram que o papel protetor da ausência de OGT em animais *Aldh1l1^{creER}/Ogt^{fl/fl}* não foi explicado por um comprometimento da geração da resposta imune periférica contra MOG. Assim, a distribuição e função efetora de células T foram equivalentes entre os grupos avaliados. Notavelmente, as diferenças significativas foram observadas durante o pico dos sinais clínicos da doença. Esses achados sugerem uma participação “local/regional” dos astrócitos e evidenciam a conhecida comunicação com os leucócitos infiltrantes. Diversos mecanismos são descritos neste sentido. Os astrócitos são cruciais na manutenção da barreira hematoencefálica e capazes de regular o recrutamento de células imunes periféricas para o sistema nervoso central (136). Por mecanismos conhecidos como astrogliose, os astrócitos formam cicatrizes gliais no parênquima cerebral e assim restringem a resposta imune local (38, 55). Adicionalmente, inúmeras moléculas bioativas são secretadas por astrócitos, com propriedades de ativar ou suprimir a resposta inflamatória (56, 137), de proteger ou agredir os neurônios e outras células gliais (37, 138).

Até o momento, não conseguimos avançar nos importantes experimentos para investigar como a deficiência de OGT afeta a dinâmica e expressão de diversas moléculas potencialmente envolvidas na regulação do sistema imunológico pelos astrócitos. Neste sentido, estudos futuros poderão revelar como ocorre a adaptação metabólica de astrócitos e neurônios nestas condições e, principalmente, quais são os genes diferencialmente regulados em astrócitos OGT-deficientes. Análises de glicoproteômica poderão complementar esses estudos e apontar as moléculas diferencialmente O-GlcNAcildas durante o curso do EAE. Sabe-se que a O-GlcNAcilação de proteínas-alvo modula funções essenciais dos macrófagos, linfócitos, neurônios e micróglia (81,83).

6. CONCLUSÃO

Nossos sugerem que a expressão de OGT e, virtualmente, a O-GlcNAcilação de proteínas é responsável pela comunicação dos astrócitos com células imunes que infiltram o SNC de animais com EAE. Estudos posteriores investigando esses mecanismos em encontram-se em andamento no nosso grupo de pesquisa e poderão identificar potenciais alvos para o tratamento de doenças que acometem o SNC.

7. REFERÊNCIAS

1. Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 2010;119(1):7-35.
2. von Bartheld CS, Bahney J, Herculano-Houzel S. The search for true numbers of neurons and glial cells in the human brain: A review of 150 years of cell counting. *J Comp Neurol.* 2016;524(18):3865-95.
3. Verkhratsky A, Parpura V. Recent advances in (patho)physiology of astroglia. *Acta Pharmacol Sin.* 2010;31(9):1044-54.
4. Verkhratsky A, Nedergaard M. Physiology of Astroglia. *Physiol Rev.* 2018;98(1):239-389.
5. Fan X, Agid Y. At the Origin of the History of Glia. *Neuroscience.* 2018;385:255-71.
6. Batiuk MY, Martirosyan A, Wahis J, de Vin F, Marneffe C, Kusserow C, et al. Identification of region-specific astrocyte subtypes at single cell resolution. *Nat Commun.* 2020;11(1):1220.
7. Ge WP, Miyawaki A, Gage FH, Jan YN, Jan LY. Local generation of glia is a major astrocyte source in postnatal cortex. *Nature.* 2012;484(7394):376-80.
8. Molofsky AV, Deneen B. Astrocyte development: A Guide for the Perplexed. *Glia.* 2015;63(8):1320-9.
9. Schober AL, Wicki-Stordeur LE, Murai KK, Swayne LA. Foundations and implications of astrocyte heterogeneity during brain development and disease. *Trends Neurosci.* 2022;45(9):692-703.
10. Habib N, McCabe C, Medina S, Varshavsky M, Kitsberg D, Dvir-Szternfeld R, et al. Disease-associated astrocytes in Alzheimer's disease and aging. *Nat Neurosci.* 2020;23(6):701-6.
11. Booth HDE, Hirst WD, Wade-Martins R. The Role of Astrocyte Dysfunction in Parkinson's Disease Pathogenesis. *Trends Neurosci.* 2017;40(6):358-70.
12. Itoh N, Itoh Y, Tassoni A, Ren E, Kaito M, Ohno A, et al. Cell-specific and region-specific transcriptomics in the multiple sclerosis model: Focus on astrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018;115(2):E302-E9.
13. Rothhammer V, Quintana FJ. Control of autoimmune CNS inflammation by astrocytes. *Semin Immunopathol.* 2015;37(6):625-38.
14. Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci.* 2006;7(1):41-53.
15. Mastrokos P, McGavern D. The anatomy and immunology of vasculature in the central nervous system. *Sci Immunol.* 2019;4(37).
16. Alvarez JI, Katayama T, Prat A. Glial influence on the blood brain barrier. *Glia.* 2013;61(12):1939-58.
17. Argaw AT, Gurfein BT, Zhang Y, Zameer A, John GR. VEGF-mediated disruption of endothelial CLN-5 promotes blood-brain barrier breakdown. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(6):1977-82.
18. Simard M, Nedergaard M. The neurobiology of glia in the context of water and ion homeostasis. *Neuroscience.* 2004;129(4):877-96.
19. Obara M, Szeliga M, Albrecht J. Regulation of pH in the mammalian central nervous system under normal and pathological conditions: facts and hypotheses. *Neurochem Int.* 2008;52(6):905-19.

20. Zador Z, Stiver S, Wang V, Manley GT. Role of aquaporin-4 in cerebral edema and stroke. *Handb Exp Pharmacol*. 2009(190):159-70.
21. Somjen GG. Ion regulation in the brain: implications for pathophysiology. *Neuroscientist*. 2002;8(3):254-67.
22. Tong X, Ao Y, Faas GC, Nwaobi SE, Xu J, Haustein MD, et al. Astrocyte Kir4.1 ion channel deficits contribute to neuronal dysfunction in Huntington's disease model mice. *Nat Neurosci*. 2014;17(5):694-703.
23. Chen MM, Hu ZL, Ding JH, Du RH, Hu G. Astrocytic Kir6.1 deletion aggravates neurodegeneration in the lipopolysaccharide-induced mouse model of Parkinson's disease via astrocyte-neuron cross talk through complement C3-C3R signaling. *Brain Behav Immun*. 2021;95:310-20.
24. Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci*. 1999;22(5):208-15.
25. Chung WS, Allen NJ, Eroglu C. Astrocytes Control Synapse Formation, Function, and Elimination. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015;7(9):a020370.
26. Khakh BS, Sofroniew MV. Diversity of astrocyte functions and phenotypes in neural circuits. *Nat Neurosci*. 2015;18(7):942-52.
27. Duan S, Anderson CM, Stein BA, Swanson RA. Glutamate induces rapid upregulation of astrocyte glutamate transport and cell-surface expression of GLAST. *J Neurosci*. 1999;19(23):10193-200.
28. Schousboe A, Waagepetersen HS. Role of astrocytes in glutamate homeostasis: implications for excitotoxicity. *Neurotox Res*. 2005;8(3-4):221-5.
29. Soni N, Reddy BV, Kumar P. GLT-1 transporter: an effective pharmacological target for various neurological disorders. *Pharmacol Biochem Behav*. 2014;127:70-81.
30. Shi Z, Zhang W, Lu Y, Xu L, Fang Q, Wu M, et al. Aquaporin 4-Mediated Glutamate-Induced Astrocyte Swelling Is Partially Mediated through Metabotropic Glutamate Receptor 5 Activation. *Front Cell Neurosci*. 2017;11:116.
31. Mahmoud S, Gharagozloo M, Simard C, Gris D. Astrocytes Maintain Glutamate Homeostasis in the CNS by Controlling the Balance between Glutamate Uptake and Release. *Cells*. 2019;8(2).
32. Fujii Y, Maekawa S, Morita M. Astrocyte calcium waves propagate proximally by gap junction and distally by extracellular diffusion of ATP released from volume-regulated anion channels. *Sci Rep*. 2017;7(1):13115.
33. Belanger M, Allaman I, Magistretti PJ. Brain energy metabolism: focus on astrocyte-neuron metabolic cooperation. *Cell Metab*. 2011;14(6):724-38.
34. Magistretti PJ, Allaman I. Lactate in the brain: from metabolic end-product to signalling molecule. *Nat Rev Neurosci*. 2018;19(4):235-49.
35. Merlini M, Meyer EP, Ulmann-Schuler A, Nitsch RM. Vascular β -amyloid and early astrocyte alterations impair cerebrovascular function and cerebral metabolism in transgenic arcA β mice. *Acta Neuropathol*. 2011;122(3):293-311.
36. Chao CC, Gutiérrez-Vázquez C, Rothhammer V, Mayo L, Wheeler MA, Tjon EC, et al. Metabolic Control of Astrocyte Pathogenic Activity via cPLA2-MAVS. *Cell*. 2019;179(7):1483-98.e22.
37. Escartin C, Galea E, Lakatos A, O'Callaghan JP, Petzold GC, Serrano-Pozo A, et al. Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions. *Nat Neurosci*. 2021;24(3):312-25.
38. Sofroniew MV. Astrogliosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014;7(2):a020420.

39. Anderson MA, Burda JE, Ren Y, Ao Y, O'Shea TM, Kawaguchi R, et al. Astrocyte scar formation aids central nervous system axon regeneration. *Nature*. 2016;532(7598):195-200.
40. Anderson MA, O'Shea TM, Burda JE, Ao Y, Barlatey SL, Bernstein AM, et al. Required growth facilitators propel axon regeneration across complete spinal cord injury. *Nature*. 2018;561(7723):396-400.
41. Liebner S, Dijkhuizen RM, Reiss Y, Plate KH, Agalliu D, Constantin G. Functional morphology of the blood-brain barrier in health and disease. *Acta Neuropathol*. 2018;135(3):311-36.
42. Colombo E, Farina C. Astrocytes: Key Regulators of Neuroinflammation. *Trends Immunol*. 2016;37(9):608-20.
43. Wheeler MA, Jaronen M, Covacu R, Zandee SEJ, Scalisi G, Rothhammer V, et al. Environmental Control of Astrocyte Pathogenic Activities in CNS Inflammation. *Cell*. 2019;176(3):581-96.e18.
44. Valentin-Torres A, Savarin C, Hinton DR, Phares TW, Bergmann CC, Stohlman SA. Sustained TNF production by central nervous system infiltrating macrophages promotes progressive autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroinflammation*. 2016;13:46.
45. Klein MA, Möller JC, Jones LL, Bluethmann H, Kreutzberg GW, Raivich G. Impaired neuroglial activation in interleukin-6 deficient mice. *Glia*. 1997;19(3):227-33.
46. Hostenbach S, Cambron M, D'haeseleer M, Kooijman R, De Keyser J. Astrocyte loss and astrogliosis in neuroinflammatory disorders. *Neurosci Lett*. 2014;565:39-41.
47. Rabchevsky AG, Weinitz JM, Coulpier M, Fages C, Tinel M, Junier MP. A role for transforming growth factor alpha as an inducer of astrogliosis. *J Neurosci*. 1998;18(24):10541-52.
48. Yong VW, Moumdjian R, Yong FP, Ruijs TC, Freedman MS, Cashman N, et al. Gamma-interferon promotes proliferation of adult human astrocytes in vitro and reactive gliosis in the adult mouse brain in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(16):7016-20.
49. Winter CG, Saotome Y, Levison SW, Hirsh D. A role for ciliary neurotrophic factor as an inducer of reactive gliosis, the glial response to central nervous system injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(13):5865-9.
50. Kang K, Lee SW, Han JE, Choi JW, Song MR. The complex morphology of reactive astrocytes controlled by fibroblast growth factor signaling. *Glia*. 2014;62(8):1328-44.
51. Tarassishin L, Suh HS, Lee SC. LPS and IL-1 differentially activate mouse and human astrocytes: role of CD14. *Glia*. 2014;62(6):999-1013.
52. Grolla AA, Fakhfouri G, Balzaretto G, Marcello E, Gardoni F, Canonico PL, et al. A β leads to Ca²⁺ signaling alterations and transcriptional changes in glial cells. *Neurobiol Aging*. 2013;34(2):511-22.
53. Talantova M, Sanz-Blasco S, Zhang X, Xia P, Akhtar MW, Okamoto S, et al. A β induces astrocytic glutamate release, extrasynaptic NMDA receptor activation, and synaptic loss. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(27):E2518-27.
54. Askarova S, Yang X, Sheng W, Sun GY, Lee JC. Role of A β -receptor for advanced glycation endproducts interaction in oxidative stress and cytosolic phospholipase A₂ activation in astrocytes and cerebral endothelial cells. *Neuroscience*. 2011;199:375-85.
55. Sofroniew MV. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci*. 2009;32(12):638-47.
56. Linnerbauer M, Wheeler MA, Quintana FJ. Astrocyte Crosstalk in CNS Inflammation. *Neuron*. 2020;108(4):608-22.

57. Brambilla R, Bracchi-Ricard V, Hu WH, Frydel B, Bramwell A, Karmally S, et al. Inhibition of astroglial nuclear factor kappaB reduces inflammation and improves functional recovery after spinal cord injury. *J Exp Med*. 2005;202(1):145-56.
58. Brambilla R, Persaud T, Hu X, Karmally S, Shestopalov VI, Dvorientchikova G, et al. Transgenic inhibition of astroglial NF-kappa B improves functional outcome in experimental autoimmune encephalomyelitis by suppressing chronic central nervous system inflammation. *J Immunol*. 2009;182(5):2628-40.
59. Liddel SA, Guttenplan KA, Clarke LE, Bennett FC, Bohlen CJ, Schirmer L, et al. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature*. 2017;541(7638):481-7.
60. Walton C, King R, Rechtman L, Kaye W, Leray E, Marrie RA, et al. Rising prevalence of multiple sclerosis worldwide: Insights from the Atlas of MS, third edition. *Mult Scler*. 2020;26(14):1816-21.
61. Bose T. Role of Immunological Memory Cells as a Therapeutic Target in Multiple Sclerosis. *Brain Sci*. 2017;7(11).
62. Lublin FD, Reingold SC, Cohen JA, Cutter GR, Sørensen PS, Thompson AJ, et al. Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions. *Neurology*. 2014;83(3):278-86.
63. O'Gorman C, Lucas R, Taylor B. Environmental risk factors for multiple sclerosis: a review with a focus on molecular mechanisms. *Int J Mol Sci*. 2012;13(9):11718-52.
64. Wu F, Cao W, Yang Y, Liu A. Extensive infiltration of neutrophils in the acute phase of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice. *Histochem Cell Biol*. 2010;133(3):313-22.
65. Miller SD, Karpus WJ. Experimental autoimmune encephalomyelitis in the mouse. *Curr Protoc Immunol*. 2007;Chapter 15:15.1.1-1.8.
66. Chastain EM, Duncan DS, Rodgers JM, Miller SD. The role of antigen presenting cells in multiple sclerosis. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1812(2):265-74.
67. Dendrou CA, Fugger L, Friese MA. Immunopathology of multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(9):545-58.
68. Wu GF, Alvarez E. The immunopathophysiology of multiple sclerosis. *Neurol Clin*. 2011;29(2):257-78.
69. Friese MA, Schattling B, Fugger L. Mechanisms of neurodegeneration and axonal dysfunction in multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol*. 2014;10(4):225-38.
70. Moreno M, Bannerman P, Ma J, Guo F, Miers L, Soulika AM, et al. Conditional ablation of astroglial CCL2 suppresses CNS accumulation of M1 macrophages and preserves axons in mice with MOG peptide EAE. *J Neurosci*. 2014;34(24):8175-85.
71. Kim RY, Hoffman AS, Itoh N, Ao Y, Spence R, Sofroniew MV, et al. Astrocyte CCL2 sustains immune cell infiltration in chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*. 2014;274(1-2):53-61.
72. Mills Ko E, Ma JH, Guo F, Miers L, Lee E, Bannerman P, et al. Deletion of astroglial CXCL10 delays clinical onset but does not affect progressive axon loss in a murine autoimmune multiple sclerosis model. *J Neuroinflammation*. 2014;11:105.
73. Krumbholz M, Theil D, Cepok S, Hemmer B, Kivisäkk P, Ransohoff RM, et al. Chemokines in multiple sclerosis: CXCL12 and CXCL13 up-regulation is differentially linked to CNS immune cell recruitment. *Brain*. 2006;129(Pt 1):200-11.
74. Eilam R, Segal M, Malach R, Sela M, Arnon R, Aharoni R. Astrocyte disruption of neurovascular communication is linked to cortical damage in an animal model of multiple sclerosis. *Glia*. 2018;66(5):1098-117.

75. Yi W, Schlüter D, Wang X. Astrocytes in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis: Star-shaped cells illuminating the darkness of CNS autoimmunity. *Brain Behav Immun*. 2019;80:10-24.
76. Brosnan CF, Raine CS. The astrocyte in multiple sclerosis revisited. *Glia*. 2013;61(4):453-65.
77. Rothhammer V, Mascalfroni ID, Bunse L, Takenaka MC, Kenison JE, Mayo L, et al. Type I interferons and microbial metabolites of tryptophan modulate astrocyte activity and central nervous system inflammation via the aryl hydrocarbon receptor. *Nat Med*. 2016;22(6):586-97.
78. Mayo L, Trauger SA, Blain M, Nadeau M, Patel B, Alvarez JI, et al. Regulation of astrocyte activation by glycolipids drives chronic CNS inflammation. *Nat Med*. 2014;20(10):1147-56.
79. Lassmann H, van Horssen J, Mahad D. Progressive multiple sclerosis: pathology and pathogenesis. *Nat Rev Neurol*. 2012;8(11):647-56.
80. Wheeler MA, Clark IC, Tjon EC, Li Z, Zandee SEJ, Couturier CP, et al. MAFG-driven astrocytes promote CNS inflammation. *Nature*. 2020;578(7796):593-9.
81. Sanmarco LM, Wheeler MA, Gutiérrez-Vázquez C, Polonio CM, Linnerbauer M, Pinho-Ribeiro FA, et al. Gut-licensed IFN γ . *Nature*. 2021;590(7846):473-9.
82. Mergenthaler P, Lindauer U, Dienel GA, Meisel A. Sugar for the brain: the role of glucose in physiological and pathological brain function. *Trends Neurosci*. 2013;36(10):587-97.
83. Kacem K, Lacombe P, Seylaz J, Bonvento G. Structural organization of the perivascular astrocyte endfeet and their relationship with the endothelial glucose transporter: a confocal microscopy study. *Glia*. 1998;23(1):1-10.
84. Loaiza A, Porras OH, Barros LF. Glutamate triggers rapid glucose transport stimulation in astrocytes as evidenced by real-time confocal microscopy. *J Neurosci*. 2003;23(19):7337-42.
85. Patching SG. Glucose Transporters at the Blood-Brain Barrier: Function, Regulation and Gateways for Drug Delivery. *Mol Neurobiol*. 2017;54(2):1046-77.
86. Itoh Y, Esaki T, Shimoji K, Cook M, Law MJ, Kaufman E, et al. Dichloroacetate effects on glucose and lactate oxidation by neurons and astroglia in vitro and on glucose utilization by brain in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(8):4879-84.
87. Herrero-Mendez A, Almeida A, Fernández E, Maestre C, Moncada S, Bolaños JP. The bioenergetic and antioxidant status of neurons is controlled by continuous degradation of a key glycolytic enzyme by APC/C-Cdh1. *Nat Cell Biol*. 2009;11(6):747-52.
88. Bittar PG, Charnay Y, Pellerin L, Bouras C, Magistretti PJ. Selective distribution of lactate dehydrogenase isoenzymes in neurons and astrocytes of human brain. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1996;16(6):1079-89.
89. Berkich DA, Ola MS, Cole J, Sweatt AJ, Hutson SM, LaNoue KF. Mitochondrial transport proteins of the brain. *J Neurosci Res*. 2007;85(15):3367-77.
90. Ramos M, del Arco A, Pardo B, Martínez-Serrano A, Martínez-Morales JR, Kobayashi K, et al. Developmental changes in the Ca²⁺-regulated mitochondrial aspartate-glutamate carrier aralar1 in brain and prominent expression in the spinal cord. *Brain Res Dev Brain Res*. 2003;143(1):33-46.
91. Mongeon R, Venkatachalam V, Yellen G. Cytosolic NADH-NAD(+) Redox Visualized in Brain Slices by Two-Photon Fluorescence Lifetime Biosensor Imaging. *Antioxid Redox Signal*. 2016;25(10):553-63.

92. Oe Y, Baba O, Ashida H, Nakamura KC, Hirase H. Glycogen distribution in the microwave-fixed mouse brain reveals heterogeneous astrocytic patterns. *Glia*. 2016;64(9):1532-45.
93. Wender R, Brown AM, Fern R, Swanson RA, Farrell K, Ransom BR. Astrocytic glycogen influences axon function and survival during glucose deprivation in central white matter. *J Neurosci*. 2000;20(18):6804-10.
94. van Deijk AF, Camargo N, Timmerman J, Heistek T, Brouwers JF, Mogavero F, et al. Astrocyte lipid metabolism is critical for synapse development and function in vivo. *Glia*. 2017;65(4):670-82.
95. Lee BE, Suh PG, Kim JI. O-GlcNAcylation in health and neurodegenerative diseases. *Exp Mol Med*. 2021;53(11):1674-82.
96. Akella NM, Ciraku L, Reginato MJ. Fueling the fire: emerging role of the hexosamine biosynthetic pathway in cancer. *BMC Biol*. 2019;17(1):52.
97. Marshall S, Bacote V, Traxinger RR. Discovery of a metabolic pathway mediating glucose-induced desensitization of the glucose transport system. Role of hexosamine biosynthesis in the induction of insulin resistance. *J Biol Chem*. 1991;266(8):4706-12.
98. Paneque A, Fortus H, Zheng J, Werlen G, Jacinto E. The Hexosamine Biosynthesis Pathway: Regulation and Function. *Genes (Basel)*. 2023;14(4).
99. Yang X, Qian K. Protein O-GlcNAcylation: emerging mechanisms and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2017;18(7):452-65.
100. Copeland RJ, Bullen JW, Hart GW. Cross-talk between GlcNAcylation and phosphorylation: roles in insulin resistance and glucose toxicity. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2008;295(1):E17-28.
101. Hurtado-Guerrero R, Dorfmueller HC, van Aalten DM. Molecular mechanisms of O-GlcNAcylation. *Curr Opin Struct Biol*. 2008;18(5):551-7.
102. Alonso J, Schimpl M, van Aalten DM. O-GlcNAcase: promiscuous hexosaminidase or key regulator of O-GlcNAc signaling? *J Biol Chem*. 2014;289(50):34433-9.
103. Bond MR, Hanover JA. A little sugar goes a long way: the cell biology of O-GlcNAc. *J Cell Biol*. 2015;208(7):869-80.
104. Yang WH, Park SY, Nam HW, Kim DH, Kang JG, Kang ES, et al. NF- κ B activation is associated with its O-GlcNAcylation state under hyperglycemic conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(45):17345-50.
105. Allison DF, Wamsley JJ, Kumar M, Li D, Gray LG, Hart GW, et al. Modification of RelA by O-linked N-acetylglucosamine links glucose metabolism to NF- κ B acetylation and transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(42):16888-93.
106. Ramakrishnan P, Clark PM, Mason DE, Peters EC, Hsieh-Wilson LC, Baltimore D. Activation of the transcriptional function of the NF- κ B protein c-Rel by O-GlcNAc glycosylation. *Sci Signal*. 2013;6(290):ra75.
107. Golks A, Tran TT, Goetschy JF, Guerini D. Requirement for O-linked N-acetylglucosaminyltransferase in lymphocytes activation. *EMBO J*. 2007;26(20):4368-79.
108. Machacek M, Saunders H, Zhang Z, Tan EP, Li J, Li T, et al. Elevated. *J Biol Chem*. 2019;294(22):8973-90.
109. Liu B, Salgado OC, Singh S, Hippen KL, Maynard JC, Burlingame AL, et al. The lineage stability and suppressive program of regulatory T cells require protein O-GlcNAcylation. *Nat Commun*. 2019;10(1):354.
110. Ryu IH, Do SI. Denitrosylation of S-nitrosylated OGT is triggered in LPS-stimulated innate immune response. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;408(1):52-7.

111. Li T, Li X, Attri KS, Liu C, Li L, Herring LE, et al. O-GlcNAc Transferase Links Glucose Metabolism to MAVS-Mediated Antiviral Innate Immunity. *Cell Host Microbe*. 2018;24(6):791-803.e6.
112. Li X, Zhang Z, Li L, Gong W, Lazenby AJ, Swanson BJ, et al. Myeloid-derived cullin 3 promotes STAT3 phosphorylation by inhibiting OGT expression and protects against intestinal inflammation. *J Exp Med*. 2017;214(4):1093-109.
113. Li X, Gong W, Wang H, Li T, Attri KS, Lewis RE, et al. O-GlcNAc Transferase Suppresses Inflammation and Necroptosis by Targeting Receptor-Interacting Serine/Threonine-Protein Kinase 3. *Immunity*. 2019;50(3):576-90.e6.
114. Park J, Ha HJ, Chung ES, Baek SH, Cho Y, Kim HK, et al. -GlcNAcylation ameliorates the pathological manifestations of Alzheimer's disease by inhibiting necroptosis. *Sci Adv*. 2021;7(3).
115. Shan X, Vocadlo DJ, Krieger C. Reduced protein O-glycosylation in the nervous system of the mutant SOD1 transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett*. 2012;516(2):296-301.
116. Wheatley EG, Albarran E, White CW, Bieri G, Sanchez-Diaz C, Pratt K, et al. Neuronal O-GlcNAcylation Improves Cognitive Function in the Aged Mouse Brain. *Curr Biol*. 2019;29(20):3359-69.e4.
117. Kim C, Nam DW, Park SY, Song H, Hong HS, Boo JH, et al. O-linked β -N-acetylglucosaminidase inhibitor attenuates β -amyloid plaque and rescues memory impairment. *Neurobiol Aging*. 2013;34(1):275-85.
118. Liu F, Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Hart GW, Gong CX. O-GlcNAcylation regulates phosphorylation of tau: a mechanism involved in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(29):10804-9.
119. Yuzwa SA, Shan X, Macauley MS, Clark T, Skorobogatko Y, Vosseller K, et al. Increasing O-GlcNAc slows neurodegeneration and stabilizes tau against aggregation. *Nat Chem Biol*. 2012;8(4):393-9.
120. Fink AL. The aggregation and fibrillation of alpha-synuclein. *Acc Chem Res*. 2006;39(9):628-34.
121. Levine PM, Galesic A, Balana AT, Mahul-Mellier AL, Navarro MX, De Leon CA, et al. α -Synuclein O-GlcNAcylation alters aggregation and toxicity, revealing certain residues as potential inhibitors of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019;116(5):1511-9.
122. Rahman MA, Hwang H, Cho Y, Rhim H. Modulation of O-GlcNAcylation Regulates Autophagy in Cortical Astrocytes. *Oxid Med Cell Longev*. 2019;2019:6279313.
123. Fan J, Zhong QL, Mo R, Lu CL, Ren J, Mo JW, et al. Proteomic Profiling of Astrocytic O-GlcNAc Transferase-Related Proteins in the Medial Prefrontal Cortex. *Front Mol Neurosci*. 2021;14:729975.
124. Fan J, Guo F, Mo R, Chen LY, Mo JW, Lu CL, et al. O-GlcNAc transferase in astrocytes modulates depression-related stress susceptibility through glutamatergic synaptic transmission. *J Clin Invest*. 2023;133(7).
125. Rothhammer V, Borucki DM, Tjon EC, Takenaka MC, Chao CC, Ardura-Fabregat A, et al. Microglial control of astrocytes in response to microbial metabolites. *Nature*. 2018;557(7707):724-8.
126. Wang J, Al-Lamki RS, Zhang H, Kirkiles-Smith N, Gaeta ML, Thiru S, et al. Histamine antagonizes tumor necrosis factor (TNF) signaling by stimulating TNF receptor shedding from the cell surface and Golgi storage pool. *J Biol Chem*. 2003;278(24):21751-60.

127. Farina C, Aloisi F, Meinl E. Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends Immunol.* 2007;28(3):138-45.
128. Dopp JM, Mackenzie-Graham A, Otero GC, Merrill JE. Differential expression, cytokine modulation, and specific functions of type-1 and type-2 tumor necrosis factor receptors in rat glia. *J Neuroimmunol.* 1997;75(1-2):104-12.
129. Blasius AL, Beutler B. Intracellular toll-like receptors. *Immunity.* 2010;32(3):305-15.
130. Matejuk A, Ransohoff RM. Crosstalk Between Astrocytes and Microglia: An Overview. *Front Immunol.* 2020;11:1416.
131. Bebo BF, Dehghani B, Foster S, Kurniawan A, Lopez FJ, Sherman LS. Treatment with selective estrogen receptor modulators regulates myelin specific T-cells and suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis. *Glia.* 2009;57(7):777-90.
132. Sahasrabudhe V, Ghosh HS. Cx3Cr1-Cre induction leads to microglial activation and IFN-1 signaling caused by DNA damage in early postnatal brain. *Cell Rep.* 2022;38(3):110252.
133. Morant-Ferrando B, Jimenez-Blasco D, Alonso-Batan P, Agulla J, Lapresa R, Garcia-Rodriguez D, et al. Fatty acid oxidation organizes mitochondrial supercomplexes to sustain astrocytic ROS and cognition. *Nat Metab.* 2023;5(8):1290-302.
134. Al-Mukh H, Baudoin L, Bouaboud A, Sanchez-Salgado JL, Maraqa N, Khair M, et al. Lipopolysaccharide Induces GFAT2 Expression to Promote. *J Immunol.* 2020;205(9):2499-510.
135. Ben Haim L, Rowitch DH. Functional diversity of astrocytes in neural circuit regulation. *Nat Rev Neurosci.* 2017;18(1):31-41.
136. Engelhardt B, Vajkoczy P, Weller RO. The movers and shapers in immune privilege of the CNS. *Nat Immunol.* 2017;18(2):123-31.
137. Sofroniew MV. Astrocyte barriers to neurotoxic inflammation. *Nat Rev Neurosci.* 2015;16(5):249-63.
138. Khakh BS, Deneen B. The Emerging Nature of Astrocyte Diversity. *Annu Rev Neurosci.* 2019;42:187-207.