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

Flávio Protasio Veras

**Investigação dos mecanismos moleculares da patogênese da psoríase:
participação da enzima glicolítica Piruvato Quinase M2 (PKM2)**

Ribeirão Preto
2018

Flávio Protasio Veras

**Investigação dos mecanismos moleculares da patogênese da psoríase:
participação da enzima glicolítica Piruvato Quinase M2 (PKM2)**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para a
obtenção do título de Doutor em
Ciências.

Área de Concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. José Carlos
Farias Alves Filho

Ribeirão Preto
2018

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 à fonte.

Ficha Catalográfica

Veras, Flávio Protásio

Investigação dos mecanismos moleculares da patogênese da psoríase: participação da enzima glicolítica Piruvato Quinase M2 (PKM2) – Ribeirão Preto, 2018.

160 f.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de Concentração: Farmacologia. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Orientador: Prof. Dr. José Carlos Farias Alves Filho

Palavras-chave: Piruvato Quinase M2, PKM2, inflamação, psoríase, queratinócitos, IL-17

FOLHA DE APROVAÇÃO

Flávio Protásio Veras

Investigação dos mecanismos moleculares da patogênese da psoríase:
participação da enzima glicolítica Piruvato Quinase M2 (PKM2)

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para a
obtenção do título de Doutor em
Ciências.

Área de Concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. José Carlos Farias
Alves Filho

Aprovada em:

Banca Examinadora:

Examinador 1:

Instituição: Assinatura: _____

Examinador 2:

Instituição: Assinatura: _____

Examinador 3:

Instituição: Assinatura: _____

Examinador 4:

Instituição: Assinatura: _____

Examinador 5:

Instituição: Assinatura: _____

Trabalho realizado no Laboratório de Inflamação e Dor do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo com auxílio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento e Tecnológico (CNPq), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos e amado pais,
Carlos Magno e Rosangela,
sempre apoiando e acreditando
em meus projetos de vida. Aos
meus, sempre presentes, irmãos
Fernanda e Carlos Magno Júnior.

AGRADECIMENTOS

A minha família, em especial meus pais Carlos Magno e Rosangela aos meus irmãos Júnior, Fernanda e minha eterna e amada Vovó Santa, sempre presentes em todos os momentos de minha vida. Agradeço aos demais familiares que sempre torceram muito para o meu sucesso.

Ao Prof. Dr. José Carlos Farias Alves Filho pela oportunidade, confiança, amizade, dedicação e paciência durante todo desenvolvimento deste trabalho. Agradeço ainda pelo amadurecimento científico crucial para minha carreira profissional.

Aos membros pela disponibilidade em participar da minha banca examinadora.

Aos docentes do grupo, Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha, Prof. Dr. Thiago M. Cunha pela competência e admiração, possibilitando discussões importantes para a realização deste trabalho e minha formação.

Aos colaboradores diretos desse trabalho que foram cruciais para experimentos em modelos animais: Bruno Melo, Douglas Prado, Thaina Norbiato, Eduardo, Rebecca Schüller e Alexei Nikolaev.

A profa. Dra. Cacilda Souza pelas amostras de pacientes e discussões que foram essenciais para aumentar a relevância deste trabalho.

A Dra. Nerry Cecilio e Gabriel Publio pelo excelente trabalho no desenvolvimento da tecnologia CRISPR/Cas9 em queratinócitos.

Ao prof. Dr. Helder Nakaya e Diógenes Lima pela participação nas análises de bioinformática.

A profa. Dra. Katiuchia Sales e Marcia Alves pelo suporte na construção dos animais KO condicionais.

Ao prof. Dr. Ari Waisman pela oportunidade no estágio de doutorado sanduíche em seu laboratório na Universidade de Mainz e pela colaboração com os modelos transgênicos de psoríase.

Ao apoio dos técnicos de laboratório, em especial: Sérgio Rosa (Serginho), Ana Kátia, Diva, Ieda, Marco Antonio, Inês, Orlando, Roberta, Eduardo, Elizabete.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Inflamação e Dor.

Aos amigos do programa de pós-graduação em Farmacologia.

Aos funcionários da secretaria do Departamento de Farmacologia da FMRP- USP: Gislaine e Ramon pela dedicação e competência nas resoluções administrativas. Obrigado pelo nosso maravilhoso convívio.

A CNPq, CAPES e FAPESP pelo auxílio financeiro para a realização deste trabalho.

Por fim, agradeço a todos que de alguma maneira contribuíram para este trabalho e também a todos que passaram de alguma forma por minha vida durante este período.

RESUMO

Veras, F.P. Investigação dos mecanismos moleculares da patogênese da psoríase: participação da enzima glicolítica Piruvato Quinase M2 (PKM2).

Tese de Doutorado – Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP.

A psoríase é uma doença inflamatória crônica com uma elevada incidência, que afeta a pele. A patogênese da psoríase caracteriza-se pela participação de inúmeras células, incluindo os queratinócitos que são as principais células efectoras da citocina IL-17, críticas para a doença, que produzidas pelas células T. Evidências crescentes sugerem o importante papel da piruvato quinase M2 (PKM2) na regulação da resposta inflamatória, mas o mecanismo subjacente permanece obscuro. Nesse sentido, no presente estudo investigamos o papel da PKM2 no desenvolvimento da psoríase. Observamos o aumento de PKM2 em biópsia humana, em modelo de psoríase induzida por imiquimode e em modelos espontâneos K14-IL-17A^{ind} e DC-IL-17A^{ind}. Em adição, esse aumento observado na enzima foi predominante nos queratinócitos e isso foi associado a marcadores de ativação de queratinócitos. Utilizando o inibidor de PKM2, Shikonin (SKN), como abordagem farmacológica, observamos que o tratamento com esse composto foi capaz de reverter a psoríase experimental e a reduzir marcadores associados a doença como: K17, LCN2, TNF- α , KC, S100A8, S100A9, IL-6 e IL-17A. Associado a isso, observamos a redução na frequência de células T ($\gamma\delta$ e $\alpha\beta$) produtoras de IL-17 e do número de neutrófilos na pele em modelo de imiquimode após inibição da PKM2. O SKN, também, reduziu o número de neutrófilos no modelo DC-IL-17A^{ind}. Em nosso próximo passo, observamos que queratinócitos HACAT estimulados com IL-17A apresentou um aumento da expressão de PKM2 e que a sua inibição foi associada a redução da ativação de queratinócitos e de mediadores inflamatórios como a IL-8. Além disso, a deleção da PKM2, utilizando a tecnologia CRISPR/Cas9, reduziu a expressão do receptor de IL-17. Por fim, o desenvolvimento da psoríase por imiquimode foi atenuada em animais deficientes para PKM2 em queratinócitos (K14-PKM2^{fl/+}), no qual foi observado a redução de neutrófilos na pele e, além disso, evidenciamos a redução da expressão de IL-17A nesses animais. O conjunto de resultados apresentados nesse trabalho demonstram que a PKM2 apresenta um papel crítico no desenvolvimento da psoríase e que a ativação do receptor de IL-17 promove um aumento da PKM2 em queratinócitos e esta contribui para ativação de mediadores que é responsável diretamente para o desenvolvimento da psoríase. Esses resultados, ainda, sugerem a PKM2 como um biomarcador para diagnóstico da psoríase e conseqüentemente, um potencial alvo terapêutico para tratamento dessa doença e outras doenças inflamatórias.

Palavras-chave: Piruvato Quinase M2, PKM2, inflamação, psoríase, queratinócitos, IL-17

ABSTRACT

Veras, F.P. **Investigation of the molecular mechanisms of pathogenesis of psoriasis: participation of the glycolytic enzyme Pyruvate Kinase M2 (PKM2).** Thesis (Doctorate) – Department of Pharmacology. Ribeirão Preto Medical School – University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP.

Psoriasis is a chronic inflammatory skin disease with high incidence in the global population. The pathogenesis of psoriasis is characterized by involvement of many cells, including keratinocytes that are targets for IL-17-producing T cells. Evidences suggests a critical role of pyruvate kinase M2 (PKM2) in inflammatory response, but the underlying mechanism remains unclear. In this context, here we investigated the role of PKM2 in the development of psoriasis. We observed overexpression of PKM2 in psoriatic human skin, imiquimod-induced psoriasis and spontaneous K14-IL-17A^{ind} and DC-IL-17A^{ind} models. In addition, the overexpression of this enzyme was observed in keratinocytes associated with keratinocytes activation markers. Using the PKM2 inhibitor, Shikonin (SKN), as a pharmacological approach, we observed that the treatment with this compound was able to reduce experimental psoriasis and disease-associated markers such as K17, LCN2, TNF- α , KC, S100A8, S100A9, IL-6 and IL-17A. Moreover, we observed reduction of frequency of IL-17-producing T cells ($\gamma\delta$ and $\alpha\beta$) and the number of neutrophils in the skin after imiquimod application plus inhibition of PKM2. SKN, also, reduced the number of neutrophils in the DC-IL-17A^{ind} model. In our next step, we observed overexpression of PKM2 in human keratinocytes HACAT stimulated with IL-17A and that its inhibition was associated with less keratinocytes activation and inflammatory mediators such as IL-8. In addition, deletion of PKM2, using CRISPR/Cas9 technology, reduced IL-17 receptor expression. Finally, the development of imiquimod-induced psoriasis was attenuated in PKM2-deficient mice in keratinocytes (K14-PKM2^{f/+}), with reduction in the number of neutrophils in the skin. In addition, we evidenced the reduction of IL-17A expression these animals. Taken together, these results demonstrate that PKM2 plays a critical role in the development of psoriasis and that IL-17 receptor activation promotes an increase of PKM2 in keratinocytes and this contributes to the release of mediators that is directly responsible for development of psoriasis. These results, suggest PKM2 as a biomarker for the diagnosis of psoriasis and consequently a potential therapeutic target for the treatment of this disease and other inflammatory diseases.

Keywords: Pyruvate Kinase M2, PKM2, inflammation, psoriasis, keratinocytes, IL-17

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1. PSORÍASE: ASPECTOS GERAIS E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	20
1.2. EPIDEMIOLOGIA E FATORES ASSOCIADOS A PSORÍASE	22
1.3. FISIOPATOLOGIA DA PSORÍASE	26
1.3.1 NEUTRÓFILOS	26
1.3.2 MACRÓFAGOS	27
1.3.3 CÉLULAS DENDRÍTICAS (DCs)	28
1.3.4 LINFÓCITOS PRODUTORES DE IL-17	31
1.4 QUERATINÓCITOS E PSORÍASE	32
1.5. ASPECTOS GERAIS DO METABOLISMO ENERGÉTICO E REPROGRAMAÇÃO METABÓLICA	35
1.6. PIRUVATO QUINASE M2 (PKM2)	37
1.7. ASPECTOS GERAIS	37
1.8. PARTICIPAÇÃO DA PKM2 NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA	39
2 HIPÓTESE DO ESTUDO	42
3 OBJETIVOS	44
3.1. OBJETIVO GERAL	45
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	45
3.2.1. CARACTERIZAR A PKM2 EM AMOSTRAS DE PELE DE PACIENTES	45
3.2.2. AVALIAR O PAPEL DA PKM2 EM MODELOS EXPERIMENTAIS DE PSORÍASE	45
3.2.3. INVESTIGAR O PAPEL DA PKM2 NA ATIVAÇÃO DE QUERATINÓCITOS IN VIVO	45
3.2.4. INVESTIGAR O PAPEL DA PKM2 NA ATIVAÇÃO DE QUERATINÓCITOS IN VITRO	45
4 METODOLOGIA	46
4.1. ANIMAIS	47
4.2. MODELO EXPERIMENTAL DE PSORÍASE	48
4.3. PACIENTES E INDIVÍDUOS CONTROLE	48

4.4. FERRAMENTAS FARMACOLÓGICAS PROTOCOLOS DE TRATAMENTO	50
4.5. AVALIAÇÃO DA LESÃO TECIDUAL.....	50
4.6. IMUNOHISTOQUÍMICA	51
4.7. IMUNOFLUORESCÊNCIA E MICROSCOPIA CONFOCAL.....	51
4.8. LINHAGEM DE QUERATINÓCITOS HUMANO HACAT	52
4.9. GERAÇÃO DA LINHAGEM HACAT DEFICIENTE PARA PKM2: TECNOLOGIA CRISPR-CAS9	53
4.10. ANÁLISE DE EXPRESSÃO GENICA.....	54
4.11. ANÁLISES DE BIOINFORMÁTICA	55
4.12. WESTERN BLOT	56
4.13. CITOMETRIA DE FLUXO.....	57
4.14. QUANTIFICAÇÃO DAS CITOCINAS	57
4.15. ANÁLISE ESTATÍSTICA	57
5 RESULTADOS.....	58
5.1. A EXPRESSÃO DE PKM2 ESTÁ ASSOCIADA AO DESENVOLVIMENTO DA PSORÍASE EM HUMANOS	59
5.2. A EXPRESSÃO DE PKM2 ESTÁ ELEVADA EM MODELOS DE PSORÍASE EXPERIMENTAL.....	61
5.3. A INIBIÇÃO DE PKM2 ATENUA O DESENVOLVIMENTO DA PSORÍASE EXPERIMENTAL	67
5.4. O TRATAMENTO COM SHIKONIN, INIBIDOR DE PKM2, PROMOVE REDUÇÃO DE FATORES ASSOCIADOS A ATIVAÇÃO DE QUERATINÓCITOS EM MODELO DE PSORÍASE INDUZIDA POR IMIQUIMODE.....	72
5.5. A INIBIÇÃO FARMACOLÓGICA DE PKM2 REDUZ NÍVEIS DE CITOCINAS PRO-INFLAMATÓRIAS NA PELE DE CAMUNDONGOS APÓS INDUÇÃO DA PSORÍASE.....	74
5.6. O INIBIDOR DE PKM2, SHIKONIN, REDUZ A FREQUÊNCIA E NÚMERO DE CÉLULAS PRODUTORAS DE IL-17 NA PELE APÓS INDUÇÃO DE PSORÍASE POR IMIQUIMODE.....	76

5.7. A INIBIÇÃO DE PKM2 REDUZ RECRUTAMENTO DE NEUTRÓFILOS NA PELE APÓS INDUÇÃO DE PSORÍASE POR IMIQUIMODE.....	80
5.8. A EXPRESSÃO DE PKM2 ESTÁ ASSOCIADA A SINALIZAÇÃO DE IL-17 EM QUERATINÓCITOS.....	82
5.9. SHIKONIN PROMOVE REDUÇÃO DA PSORÍASE EM MODELO TRANSGÊNICO E ESPONTÂNEO DC-IL17A ^{IND}	84
5.10. O TRATAMENTO CRÔNICO COM INIBIDOR DE PKM2 PROMOVE MENOR RECRUTAMENTO DE NEUTRÓFILOS NA PELE APÓS DESENVOLVIMENTO ESPONTÂNEO DE PSORÍASE UTILIZANDO CAMUNDONGOS DC-IL17A ^{IND}	87
5.11. A ATIVAÇÃO DE QUERATINÓCITOS PELA IL-17A PROMOVE AUMENTO DA EXPRESSÃO DE PKM2	90
5.12. A INIBIÇÃO FARMACOLÓGICA IN VITRO DA PKM2 REDUZ A PRODUÇÃO DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS EM QUERATINÓCITOS	93
5.13. O SILENCIAMENTO GÊNICO DA ENZIMA PKM2 EM QUERATINÓCITOS, UTILIZANDO TECNOLOGIA CRISPR-CAS9, INIBE A PRODUÇÃO DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS	95
5.14. A ENZIMA PKM2 CONTRIBUI PARA A EXPRESSÃO DO RECEPTOR DE IL-17 EM QUERATINÓCITOS HACAT ATIVADOS.....	99
5.15. ANIMAIS DEFICIENTES PARA PKM2 EM QUERATINÓCITOS APRESENTAM MENOR DESENVOLVIMENTO DA PSORÍASE INDUZIDA POR IMIQUIMODE	101
5.16. A DELEÇÃO GÊNICA DE PKM2 EM QUERATINÓCITOS REDUZ A PRODUÇÃO DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS APÓS PSORÍASE INDUZIDA POR IMIQUIMODE	105
5.17. A AUSÊNCIA DE PKM2 EM QUERATINÓCITOS PROMOVE A REDUÇÃO DE RECRUTAMENTO DE NEUTRÓFILOS NA PELE DE CAMUNDONGOS APÓS INDUÇÃO DA PSORÍASE	107
6 DISCUSSÃO	109
7 CONCLUSÃO	122
8 REFERÊNCIAS.....	125
9 ANEXOS	150

1. INTRODUÇÃO

1.1. PSORÍASE: ASPECTOS GERAIS E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

A psoríase (PsO) é uma doença inflamatória crônica que afeta a pele, decorrente da desregulação dos elementos presentes na epiderme e na derme (Boehncke & Schön, 2015; Di Meglio & Nestle, 2017; Greb et al., 2016; M. a Lowes, Bowcock, & Krueger, 2007). Esta doença é de origem autoimune, no qual caracteriza-se por falhas nos mecanismos de tolerância imunológica acarretando proliferação de linfócitos auto-reativos, que por sua vez, desencadeiam uma resposta inflamatória. Esse mecanismo é semelhante a outras doenças autoimunes, tais como, a doença de Crohn, artrite reumatóide, esclerose múltipla e diabetes (Perera, Di Meglio, & Nestle, 2012; Rosenblum, Remedios, & Abbas, 2015).

A psoríase pode se manifestar em vários fenótipos, incluindo psoríase vulgar, psoríase gutata, psoríase inversa, psoríase pustulosa e psoríase eritrodérmica, sendo que múltiplos fenótipos podem ocorrer no mesmo indivíduo (C. E. M. C. Griffiths & Barker, 2007; C. E.M. Griffiths et al., 2007). A psoríase vulgar é a manifestação mais comum e os sintomas que são compartilhados por todos os fenótipos são coceira, queimação e dor. A extensão do envolvimento da pele é variável e a maioria dos tipos de psoríase tem uma evolução cíclica, com exacerbação da lesão por algumas semanas ou meses, depois a redução por algum tempo ou até mesmo entrando em um período de remissão (Greb et al., 2016; C. E. M. C. Griffiths & Barker, 2007).

Psoríase vulgar – É caracterizada por áreas bem definidas de placas eritematosas e endurecidas com escala prateada sobrejacente. Os joelhos,

cotovelos, couro cabeludo e tronco são as áreas da pele mais comumente afetadas (Greb et al., 2016; C. E.M. Griffiths et al., 2007) (**Fig. 1A**).

Psoríase gutata – É Segundo tipo mais comum de psoríase. É caracterizada por pápulas pequenas, em formato de lágrima, que geralmente começam na infância ou na idade jovem adulta e podem ser desencadeadas por uma infecção, como a faringite estreptocócica (Greb et al., 2016; C. E. M. C. Griffiths & Barker, 2007)(**Fig. 1B**).

Psoríase inversa – É caracterizada por placas eritematosas nas dobras corporais e, devido ao aumento da umidade nessas áreas, os pacientes, muitas vezes, não apresentam descamação. Muitos indivíduos com psoríase inversa também podem ser acometidos com outros subtipos de psoríase simultaneamente (Greb et al., 2016; C. E. M. C. Griffiths & Barker, 2007)(**Fig. 1C**).

Psoríase pustulosa – É caracterizada por pústulas estéreis sobre uma base eritematosa e observada principalmente em adultos. Geralmente, se apresenta nas mãos e pés e tende a evoluir através de um ciclo, com eritema seguido da formação de pústulas e descamação (Greb et al., 2016; C. E. M. C. Griffiths & Barker, 2007) (**Fig. 1D**).

Psoríase eritrodérmica – É a forma mais grave de psoríase que pode ser fatal. Esse tipo apresenta a geração de eritema disseminado em, pelo menos, 90% do corpo, o que pode causar coceira e dor severas, e pode estar associado à descamação da pele em demasia. Afeta cerca de 3% dos indivíduos com psoríase e geralmente ocorre em pacientes com psoríase vulgar instável (Greb et al., 2016; C. E. M. C. Griffiths & Barker, 2007) (**Fig. 1E**).

A PsO está associada a prejuízos na qualidade de vida, mesmo em casos leves, e com excesso de risco cardiovascular, diabetes e doenças mentais. A mortalidade pode ocorrer em pacientes com estado mais grave da doença, mas também está associada a um alto grau de morbidade (Gottlieb, Chao, & Dann, 2008; Greb et al., 2016).

Figura 1 – Manifestações clínicas da psoríase. Ilustração representativa de pacientes com: **A)** Psoríase vulgar, **B)** Psoríase gutata, **C)** Psoríase inversa, **D)** Psoríase pustulosa, **E)** Psoríase eritrodérmica. Adaptado de Greb *et al* 2016.

1.2. EPIDEMIOLOGIA E FATORES ASSOCIADOS A PSORÍASE

PREVALÊNCIA

A PsO possui uma incidência global entre 2% a 3% da população com uma prevalência maior em populações caucasianas (4,6% e 4,7%, respectivamente), em comparação com 0,4% a 0,7% de africanos, afro-americanos e populações asiáticas, por exemplo (Parisi, Symmons, Griffiths, & Ashcroft, 2013). No Brasil não existem muitos estudos sobre a sua prevalência, no entanto, acredita-se que aproximadamente 1% da população seja acometida. Um mapeamento realizado pela Sociedade Brasileira de Dermatologia (SBD) demonstra que habitantes da região sul do país apresenta o dobro de

prevalência comparado a região norte do país (Di Meglio & Nestle, 2017; Romiti, Amone, Menter, & Miot, 2017).

A PsO apresenta uma distribuição bimodal, com um pico entre 15 e 30 anos e outro entre 50 e 60 anos (Greb et al., 2016). Além disso, esta doença apresenta um alto impacto econômico com custos direto entre 51,7 a 63,2 bilhões dólares e custos indiretos entre 23,9 a 35,4 bilhões dólares (Brezinski, Dhillon, & Armstrong, 2015).

Figura 2 – Distribuição global da psoríase. Essa ilustração demonstra que países de população caucasianas apresentam grande prevalência em comparação a outras etnias. O Brasil mostra-se com uma prevalência intermediária. Adaptado de Greb *et al* 2016.

FATORES GENÉTICOS

A predisposição genética, claramente, desempenha um papel no desenvolvimento da psoríase. Exemplos de observações que apoiam uma contribuição de fatores genéticos incluem: **1)** Aproximadamente 40% dos pacientes com psoríase ou artrite psoriásica têm uma história familiar desses distúrbios em parentes de primeiro grau; **2)** A psoríase tende a ser mais concordante entre os gêmeos monozigóticos do que entre os gêmeos dizigóticos; **3)** Estudos de associação genômica identificaram múltiplos *loci* de susceptibilidade para a psoríase, muitos dos quais contêm genes envolvidos na

regulação do sistema imunológico (Perera et al., 2012; Roberson & Bowcock, 2010).

O locus da susceptibilidade à psoríase (*PSORS1*) dentro do HLA no cromossomo 6p21 é considerado um dos principais determinantes genéticos da psoríase. Entre outros genes do HLA que têm sido associados à psoríase, o HLA-Cw6 é descrito como alelo mais importante para a susceptibilidade à psoríase de início precoce e o HLA-B17 pode estar associado a um fenótipo mais grave (L. Chen & Tsai, 2018; Greb et al., 2016; Johann E. Gudjonsson & Elder, 2007).

FATORES AMBIENTAIS

Além dos fatores genéticos, várias outras exposições e características são descritas como fatores de risco ou fatores exacerbadores da psoríase, dentre eles:

Tabaco – O tabaco está caracterizado como um fator ambiental de risco para a psoríase. Autores demonstram que há uma maior prevalência de tabagismo entre indivíduos com psoríase em comparação a indivíduos sem psoríase. Além disso, fumantes são mais propensos a desenvolver psoríase do que os não fumantes. A intensidade e a duração do tabagismo parecem aumentar o risco de desenvolvimento de psoríase (Armstrong, Harskamp, Dhillon, & Armstrong, 2014; Torii et al., 2011).

Obesidade – A psoríase tem sido associada com obesidade e maior índice de massa corporal (IMC), tanto em adultos quanto em crianças. No passado, pensava-se que a obesidade era resultado de padrões de comportamento não saudáveis, no entanto, alguns autores sugerem que a

obesidade pode contribuir para o desenvolvimento de uma doença mais grave (Gottlieb et al., 2008; Jensen & Skov, 2017).

Medicamentos – Vários medicamentos estão associados a um agravamento da psoríase. Os agentes mais comuns são betabloqueadores, lítio e antimaláricos (Rongioletti, Fiorucci, & Parodi, 2009; Shah, Desai, Patel, & Singh, 2012). Além disso, é descrito que a psoríase pode ser desencadeada em pacientes predispostos ou se agravar após o tratamento tópico com imiquimode, um imunomodulador agonista dos receptores do tipo Toll 7 e 8 (TLR7/8). De maneira interessante, um estudo realizado por Van der Fits e colaboradores desenvolveu o modelo experimental mais utilizado para o estudo da psoríase, utilizando o imiquimode tópico em camundongos, no qual gera uma resposta inflamatória e mimetiza lesões semelhantes a psoríase humana (van der Fits et al., 2009).

Infecções – As infecções bacterianas e virais também podem estar associadas ao agravamento da psoríase. As erupções pós-estreptocócicas na psoríase gutata e o aparecimento ou agravamento da psoríase em associação com a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) são contribuintes bem reconhecidos (Fry & Baker, 2007; J. E. Gudjonsson, Thorarinsson, Sigurgeirsson, Kristinsson, & Valdimarsson, 2003; Mamkin, Mamkin, & Ramanan, 2007).

Álcool – Abuso de álcool ocorre com maior frequência em pacientes com psoríase, e o uso de álcool pode estar associado ao risco de desenvolvimento ou agravamento da psoríase. Além disso, o alcoolismo é considerado um fator de risco significativo para mortalidade entre pacientes com psoríase. O consumo de álcool reduz a resposta ao tratamento convencional da

psoríase e acredita-se que isso seja devido à redução da adesão. Além disso, o consumo de álcool tem sido associado a um aumento da toxicidade hepática do metotrexato, uma importante opção terapêutica no tratamento da psoríase (Cassano, Vestita, Apruzzi, & Vena, 2011).

1.3. FISIOPATOLOGIA DA PSORÍASE

A psoríase é uma doença inflamatória imunomediada complexa que, como descrito acima, ocorre em indivíduos geneticamente suscetíveis e se caracteriza pelo desenvolvimento de placas inflamatórias na pele. Eventos celulares contribuem para a patogênese da PsO e envolve a desregulação dos componentes celulares envolvidos na montagem de uma resposta imune à barreira da pele, conduzindo a uma resposta inflamatória crônica (M. a Lowes et al., 2007).

A psoríase apresenta respostas dinâmicas mediadas por vários tipos de células. Os tipos de células identificados no interior das placas psoriásicas incluem: neutrófilos, macrófagos, células dendríticas (DCs), linfócitos e queratinócitos (KCs) (Albanesi, 2012; Greb et al., 2016; M. a Lowes et al., 2007; Nickoloff & Nestle, 2004).

1.3.1. NEUTRÓFILOS

Os neutrófilos, estão associados a exacerbação da inflamação no microambiente inflamatório, formam microabscessos na psoríase vulgar e erosões na psoríase pustulosa (C. E. M. C. Griffiths & Barker, 2007). De maneira geral, essas células fagocitam imunocomplexos e liberam proteases, espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS) causando danos a pele. Além

disso, os neutrófilos são capazes de secretar mediadores inflamatórios, como IFN- γ e TNF- α (Kolaczowska & Kubes, 2013; Németh & Mócsai, 2012).

Acredita-se que estas células são constantemente recrutadas para o microambiente inflamatório cutâneo por um gradiente quimiotático através da produção de quimiocinas pelos queratinócitos, como IL-8 e CXCL1. Em adição, os neutrófilos podem contribuir para a proliferação de queratinócitos e atuar na manutenção da doença (Tonello, Rizzi, Migliario, Rocchetti, & Renò, 2017). Alguns estudos demonstraram que proteases produzidas pelos neutrófilos, tais como elastase e catepsina G, são capazes de induzir a proliferação de queratinócitos e que a inibição desses fatores reduz a resposta inflamatória. Além disso, neutrófilos estão associados às funções patogênicas da IL-17, um mediador-chave na patogênese na psoríase (Henry et al., 2016).

Apesar de sua presença proeminente na pele psoriásica, o papel funcional dos neutrófilos ainda permanece obscuro, embora, terapias farmacológicas exercem seus efeitos, pelo menos em parte, através da redução dos neutrófilos.

1.3.2. MACRÓFAGOS

Os macrófagos estão presentes nas lesões psoriásicas, via produção de TNF- α , e também parecem participar do desenvolvimento da inflamação da pele na psoríase (Donn et al., 2004; Yawalkar, Tschärner, Hunger, & Hassan, 2009). Os macrófagos da pele são residentes na derme saudável, mas podem migrar para os linfonodos em condições de inflamação da pele atuando como uma célula apresentadora de antígeno (APC) (Malissen, Tamoutounour, & Henri, 2014). Um subconjunto de macrófagos da pele residentes no tecido que

expressam CD163, encontrado na maioria dos macrófagos, e o fator de coagulação XIIIa, tem sido implicado no processo de reparo tecidual. Ainda, dentre suas diversas funções, está o papel na regulação da fibroproliferação e angiogênese (Fuentes-Duculan et al., 2010).

A importância dos macrófagos na psoríase, assim como os neutrófilos, não é bem compreendida, entretanto, a depleção de macrófagos pode reverter alterações da inflamação de pele em modelo experimental de psoríase (Morimura, Oka, Sugaya, & Sato, 2016).

1.3.3. CÉLULAS DENDRÍTICAS (DCs)

As DCs são células do sistema imunológico que interligam a imunidade inata e adaptativa, atuando como APC profissionais e induzindo respostas adaptativas mediadas por células T (Malissen et al., 2014). Dentre as DCs, destaca-se as células de Langerhans (LCs), células dendríticas plasmocitóides (pDCs) e células dendríticas mielóides (mDCs). Esses subtipos, são caracterizados por apresentar um importante papel no desenvolvimento da psoríase. As LCs estão localizadas na epiderme e as pDCs e mDCs na região da derme (Bell, 2008).

LCs – As LCs são caracterizadas pela expressão de vários marcadores, incluindo: Langerina (CD207), EpCAM (CD326), CD1a e E-caderina. De maneira geral, em condições de homeostase, as LCs residem em uma forma imatura nas camadas basal e suprabasal da epiderme e estão intimamente associadas com os KCs pela E-caderina (Cumberbatch et al., 2006). Recentemente, foi demonstrado que a apresentação de antígenos lipídicos pelas LCs via CD1a é

essencial para o controle da inflamação na pele, por aumento de células produtoras de IL-17 (J. H. Kim et al., 2016).

pDCs – As pDCs são uma população de células especializadas que durante a resposta inflamatória possuem elevado número na pele psoriásica (Bell, 2008). As pDCs, normalmente, não observadas em pele sadia, são identificadas nas placas psoriásicas e na região não acometida de pacientes com psoríase (Zaba, Krueger, & Lowes, 2009). Um papel inicial para as pDCs foi demonstrado em um modelo de camundongo de xenotransplante de psoríase humana, no qual a inibição da liberação de IFN- α , por meio das pDCs, impediu a ativação e expansão de células T e o desenvolvimento de psoríase (Nestle et al., 2005).

Durante a homeostase, as pDCs são tolerantes ao auto-DNA ou RNA liberados nas células da pele inflamada. A quebra da tolerância aos auto-ácidos nucleicos ocorre quando o auto-DNA e o RNA agregado com a catelicidina LL-37 induzem ativação da pDC e a produção de IFN do tipo I, com isso os complexos LL-37-auto-DNA iniciam uma interação com as células epidérmicas inflamadas e os pDCs recrutados. Além de outros mediadores pró-inflamatórios, como TNF, IL-6 e IL-1 β (liberados por KCs), o IFN- α derivado de pDC promove a maturação e ativação de mDCs, que são fundamentais para sustentar e amplificar respostas de células T na inflamação da pele (Gilliet & Lande, 2008; Lande et al., 2007).

mDCs – As mDCs estão em grande número na derme durante o desenvolvimento da psoríase, isso sugere que essas células podem desempenhar um papel crítico na doença. Esse subtipo celular, é fonte de mediadores pró-inflamatórios tais como o TNF- α que atua na ativação de KCs

que passam a expressar ICAM-1 e a produzir mediadores quimioatrativos e proinflamatórios, como IL-8, IL-6 e IL-1 (Bell, 2008).

O destaque maior das mDCs é a produção de IL-23. Elas são as principais células produtoras de IL-23 na pele durante a psoríase. A IL-23 é uma citocina, composta por uma subunidade p19 e uma subunidade p40 (Vanden Eijnden, Goriely, De Wit, Goldman, & Willems, 2006). O seu receptor, IL-23R, é expresso em linfócitos T $\alpha\beta$ e $\gamma\delta$ e a ativação desse receptor induz fosforilação de STAT3 para induzir os fatores de transcrição ROR γ t e ROR α t estabelecendo a diferenciação celular específica para linfócitos T produtores de IL-17 (Di Cesare, Di Meglio, & Nestle, 2009). Adicionalmente, outros eventos descritos suportam a importância desse mediador na psoríase, dentre eles: **1)** os níveis de IL-23 são reduzidos em resposta ao tratamento eficaz da psoríase; **2)** A injeção de IL-23 na pele normal de camundongos produz alterações semelhantes à psoríase; **3)** A ausência ou bloqueio da IL-23 reduz o desenvolvimento da psoríase experimental (Dolgin, 2016; van der Fits et al., 2009; Zheng et al., 2007)

O eixo IL-23/IL-17 é considerado um dos pontos mais críticos no desenvolvimento e manutenção da psoríase, além de outras doenças autoimunes (Di Cesare et al., 2009). Estratégias terapêuticas de neutralização da IL-23 são utilizadas durante o tratamento da psoríase, em casos mais graves ou de refratariedade aos tratamentos convencionais. O Ustekinumabe, por exemplo, um anticorpo monoclonal que inibe os efeitos da IL-23 nas células Th17 ao inibir a ligação da IL-23 ao receptor da IL-23, é extremamente eficaz no tratamento da psoríase (Dolgin, 2016; Christopher E.M. Griffiths et al., 2010).

1.3.4. LINFÓCITOS PRODUTORES DE IL-17

Tem sido demonstrado a participação de diferentes subgrupos de células T na patogênese da PsO. Um importante destaque tem sido dado às células T produtoras de IL-17 ($T_{\alpha\beta}$, e $T_{\gamma\delta}$). Modelos experimentais de PsO e pacientes que apresentam a doença apresentam níveis elevados de IL-17, apresentando uma correlação positiva com a progressão da doença que desempenham um papel crítico na patogênese e perpetuação da PsO (Cai et al., 2011; Korn, Bettelli, Oukka, & Kuchroo, 2009; M. A. Lowes et al., 2008; van der Fits et al., 2009).

As células $T_{\alpha\beta}$ produtoras de IL-17 ou células Th17 são caracterizadas pela produção de IL17A além da coprodução de IL-17F, IL-21 e IL-22 que atuam coordenadamente para mediar a inflamação tecidual. As células Th17 diferenciam-se a partir de células T CD4 em resposta ao TGF- β e IL-6, induzindo a expressão de ROR γ t, um fator de transcrição essencial para a geração de células Th17. O desenvolvimento desse subtipo celular inclui basicamente três etapas: diferenciação, amplificação e estabilização. TGF- β + IL-6 induz diferenciação, a IL-21 produzida pelo desenvolvimento de células Th17 medeia a amplificação e a IL-23 expande e estabiliza células Th17 previamente diferenciadas. Nesse sentido, a exposição à IL-23 é crítica para induzir o potencial patogênico em células Th17 e manutenção da psoríase (Korn et al., 2009) .

As células T $\gamma\delta$ são responsáveis por aproximadamente 3-5% de todas as células linfoides encontradas nos tecidos linfóides secundários e no sangue. No entanto, as células T $\gamma\delta$ são muito mais prevalentes em mucosas e células epiteliais, especialmente no intestino e pele. O TCR $\gamma\delta$ é constituído por uma

cadeia γ e uma cadeia δ que está localizada no mesmo local que a cadeia α do TCR. As células T $\gamma\delta$ são ativadas por IL-1 β e IL-23, e são a principal fonte de IL-17 na pele, sendo que o subconjunto V γ 4 e V δ 4 de células T $\gamma\delta$ são as principais fontes de IL-17 durante o desenvolvimento da psoríase (Cai et al., 2011; Chien, Meyer, & Bonneville, 2014) .

A IL-17A biologicamente ativa, produzida por linfócitos T $\alpha\beta$, e T $\gamma\delta$, liga-se ao seu receptor IL-17R que é expresso por várias células, como monócitos, células epiteliais, sinoviócitos, fibroblastos e queratinócitos (Korn et al., 2009).

1.4. QUERATINÓCITOS E PSORÍASE

Os queratinócitos são as células mais abundantes da pele, situadas na epiderme, com função sintetizar componentes estruturais que formam a camada epitelial, principalmente a queratina, proteína que garante impermeabilidade, elasticidade e resistência à pele (Eckert & Rorke, 1989).

Na epiderme, os queratinócitos estão organizados em cinco camadas ou estratos: o estrato basal, o estrato espinhoso, o estrato granuloso, o estrato lúcido e o estrato córneo. Esses estratos se originam na camada mais interna da epiderme, que é o estrato basal, seguem até o estrato espinhoso por divisão celular, mantendo algumas células progenitoras na camada basal, enquanto as outras seguem para as camadas subsequentes. No estrato espinhoso se inicia o processo de diferenciação onde os queratinócitos passam por mudanças bioquímicas e morfológicas chegando ao estrato córneo como células mortas de superfície sendo formadas principalmente de filamentos de queratina. Esse processo é estritamente regulado em cada camada e a perturbação desse processo contribui para a perda função da barreira epitelial e o surgimento de

doenças de pele, como a psoríase (Byrd, Belkaid, & Segre, 2018; Juráňová, Franková, & Ulrichová, 2017; Sotiropoulou & Blanpain, 2012).

Sob condições de homeostasia, a epiderme protege o organismo às agressões externas, porém sob determinados estímulos, como por exemplo, uma substância irritante ou um patógeno, os queratinócitos podem participar da gênese e manutenção da resposta inflamatória na pele (Juráňová et al., 2017). Nesse sentido, vários estudos demonstraram a capacidade dos queratinócitos produzir citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-6, IL-8, IL-1 β e TNF- α . Com isso, essas células são capazes de interagir com células do sistema imunológico por meio da produção de mediadores inflamatórios, apresentando um papel central durante o desenvolvimento da psoríase (Tonel & Conrad, 2009; Xiao et al., 2014).

A ativação dos queratinócitos é favorecida em resposta a vários estressores, incluindo citocinas e fatores de crescimento, e é observada tanto em processos de cicatrização quanto na psoríase. A ativação é desencadeada por moléculas sentinelas dos KCs que indicam danos, que levam à proliferação de KC. KCs ativados exibem um fenótipo que expressa as proteínas K6, K16 e K17, para células diferenciadas, são hiperproliferativos e migratórios; e podem sofrer alterações seu citoesqueleto, amplificar seus receptores de superfície celular e produzir constituintes da membrana basal (Coimbra, Figueiredo, Castro, Rocha-Pereira, & Santos-Silva, 2012; Greb et al., 2016; Juráňová et al., 2017).

Uma das principais moléculas para ativação dos KCs é a citocina IL-17. Esta célula possui alta expressão do receptor de IL-17 (IL-17R) e sua ativação contribui para diversas funções durante a psoríase. O eixo IL-23 / IL-17 influencia

a ativação da via NF- κ B de múltiplas maneiras. IL-17RA e IL-17RC interagem através de domínios com a proteína adaptadora Act1. A Act1 associa-se com a I κ B quinase induzível (IKKi) que é indispensável para a neutrofilia induzida por IL-17. A fosforilação do Act1 (S311) leva à formação do fator associado ao receptor do fator de necrose tumoral (TRAF), 2-Act1, TRAF5-Act1 e à estabilização do RNAm da CXCL1 e IL-8, importantes quimioatraentes neutrofílicos. Além do TRAF2 e TRAF5, o Act1 também se liga ao TRAF6 para ativar a proteína ativadora 1 do NF- κ B (AP-1) ou a cascata da proteína C/EBP. Independentemente do IKKi, o Act1 promove ubiquinação de TRAF6 levando à ativação do NF- κ B (Chiricozzi et al., 2011; M. A. Lowes, Russell, Martin, Towne, & Krueger, 2013; May, 2011; Tonel & Conrad, 2009; Zhu et al., 2010).

IL-17A, como supracitado, pode contribuir para o processo inflamatório durante a psoríase, associado com acúmulo de células T na lesão psoriásica. Além disso, a IL-17 induz proliferação e ativação de queratinócitos que produzem citocinas pró-inflamatórias (por exemplo, TNF- α e IL-8) e peptídeos antimicrobianos (por exemplo, S100A9 e β -defensinas), que podem contribuir para o recrutamento e acumulação de neutrófilos encontrados nas lesões da psoríase, contribuindo para a inflamação crônica. Assim, a IL-17 atua em múltiplas células, mas principalmente em KCs que contribui para inflamação na pele durante a psoríase (M. A. Lowes et al., 2013).

Diversas terapias moleculares que visam diretamente a atividade biológica da IL-17A estão em desenvolvimento para o tratamento da psoríase. O Secukinumabe, por exemplo, é um anticorpo monoclonal neutralizante específico da IL-17A humana. Em pacientes com psoríase, o Secukinumabe demonstrou uma redução de 58% no índice PASI em comparação com os

índices iniciais nos indivíduos que receberam uma única administração do fármaco, e a resposta foi mantida 12 semanas após o tratamento (Langley et al., 2014).

1.5. ASPECTOS GERAIS DO METABOLISMO ENERGÉTICO E REPROGRAMAÇÃO METABÓLICA

As operações diárias de uma célula são realizadas através das reações bioquímicas que ocorrem dentro da célula. O metabolismo energético celular refere-se aos processos pelos quais a células utilizam para gerar energia na forma de ATP (O'Neill, Kishton, & Rathmell, 2016).

A fonte preferencial de carbono para as células de mamíferos, a glicose, é reduzida ao piruvato através da via de glicólise multi-enzimática regulada, com o piruvato entrando na mitocôndria para alimentar o ciclo do ácido tricarboxílico (TCA). Alternativamente, o catabolismo de ácidos graxos pode gerar acetil-coA para alimentar o TCA e a geração de ATP através de um processo conhecido como β -oxidação (Hui et al., 2017).

O TCA é um processo oxidativo de múltiplos passos que gera sequencialmente um número de intermediários de carbono dentro da matriz mitocondrial, com geração simultânea de NADH e FADH₂. Esses agentes redutores alimentam a cadeia transportadora de elétrons na membrana mitocondrial interna no Complexo I e no Complexo II, respectivamente, conduzindo a transferência de elétrons que é acoplada ao bombeamento de prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembranar. Isso cria um gradiente de prótons eletroquímico que pode ser acelerado pela ATP sintase para impulsionar a produção de grandes quantidades de ATP (moléculas de 36-

38 ATP por molécula de glicose). Os elétrons transferidos ao longo da cadeia transportadora de elétrons são eventualmente usados na geração de água a partir do oxigênio molecular. Assim, a fosforilação oxidativa requer oxigênio. Na ausência de oxigênio, o piruvato é metabolizado em lactato no citoplasma, com a glicólise fornecendo pequenas quantidades, porém rapidamente, de ATP (2 moléculas de ATP por molécula de glicose) para atender energia requisitos (Koopman et al., 2013; Reinecke, Smeitink, & van der Westhuizen, 2009).

Vários processos biológicos foram descritos onde piruvato é preferencialmente metabolizado ao Lactato apesar da disponibilidade do oxigênio, um processo denominado Glicólise Aeróbica ou efeito Warburg. Essa mudança metabólica para a glicólise aeróbica, ou “reprogramação metabólica”, é bem reconhecida em células tumorais e células do sistema imunes ativadas, ocorrendo junto com o metabolismo lipídico e o metabolismo de aminoácidos, os quais emergiram como mediadores-chave da função imunológica (Heiden, Cantley, & Thompson, 2009; Warburg, 1956).

Um dos mediadores do efeito Warburg é o fator de induzível por hipóxia 1 alfa (HIF-1 α), um regulador essencial do metabolismo, expresso em baixos níveis de oxigênio ou hipóxia. Autores demonstram que essa molécula contribui para a diferenciação das células Th17 através da ativação de ROR γ t, o principal fator de transcrição para esse tipo celular. Os autores também demonstraram que o HIF-1 α é capaz de se ligar ao Foxp3, o principal regulador das Tregs, atenuando o seu desenvolvimento. Além disso, camundongos deficientes para HIF-1 α não conseguiram gerar células Th17, mas apresentaram um aumento na população Treg em modelo experimental de esclerose múltipla. Sendo assim, a reprogramação metabólica contruibui para o controle e desenvolvimento da

modulação do sistema imune (L. Z. Shi et al., 2011).

Além do HIF-1 α , existem outras moléculas importantes para a regulação da reprogramação metabólica como, a enzima piruvato quinase M2 (PKM2), no qual foi descrito sua importância em células tumorais e recentemente no sistema imune.

1.6. PIRUVATO QUINASE M2 (PKM2)

1.6.1. ASPECTOS GERAIS

A piruvato quinase (PK) é uma enzima presente na via glicolítica que catalisa a desfosforilação de fosfoenolpiruvato (PEP) para piruvato. Existem quatro isoformas da PK (L, R, M1 e M2) presentes em mamíferos. Os isotipos de L e R são codificados pelo gene *PKLR* e possui uma distribuição específica e regulação por diferentes promotores (Mazurek, 2011). O isotipo L é expresso no fígado, rim e intestino, e o isotipo R é expresso em eritrócitos. Os isotipos PKM1 e PKM2 são codificados pelo gene *PKM* e são produtos de processamento alternativo de exons (exon 9 e exon 10, respectivamente). A PKM1 é constitutiva em todos os tecidos em que grandes quantidades de energia são requeridas para funções homeostáticas, como músculo e cérebro, além disso, esta isoenzima tem a maior afinidade para o seu substrato fosfoenolpiruvato (PEP), não é regulada alostericamente e não é fosforilada (Mazurek, 2011; Semenova & Chernoff, 2012).

A PKM2 é expressa em alguns tecidos diferenciados, como: adiposo, pulmonar, retina, ilhotas pancreáticas. Esta isoenzima é expressa em células com uma elevada taxa de síntese de ácido nucléico, ou seja, todas as células em processo de proliferação, como: as células normais em proliferação, células

embrionárias, células-tronco e especialmente células tumorais. A PKM1 forma um tetrâmero constitutivamente ativo e estável, no entanto, a atividade de PKM2 é controlada por vários efetores alostéricos e modificações pós-translacionais que afetam sua estabilidade em tetrâmero e dímero. A ligação de frutose 1,6-difosfato (FBP), um intermediário da glicólise, promove uma mudança conformacional da PKM2 numa conformação ativa e estável, semelhante à da PKM1. As diferenças conformacionais da PKM2 irão proporcionar funções distintas e, embora, estes eventos ilustram uma complexa regulação da atividade da PKM2, ativos ou inativos, como uma enzima glicolítica, a significância fisiológica destes estados não é bem compreendida (Anastasiou et al., 2012; Jurica et al., 1998; Morgan et al., 2013).

Foi também descrito que, em sua forma dimérica, ela apresenta função de coativador transcricional do fator de transcrição HIF1- α , apresentando atividade no núcleo da célula (Wang et al., 2014). Além disso, já foi descrito que a forma dimérica da PKM2 não atua somente como um coativador transcricional, mas também pode agir como uma proteína quinase que fosforila substratos envolvidos no processo de reprogramação metabólica, por exemplo fosforilando diretamente STAT3 (Christofk, Vander Heiden, Wu, Asara, & Cantley, 2008; Li et al., 2015).

A atividade enzimática da PKM2 é regulada alostericamente tanto por produtos metabólicos, como aminoácidos, como por vias de sinalização intracelular, esses juntos coordenam assim a atividade da PKM2. Foi demonstrado que a expressão da PKM2 é regulada pela via mTOR, onde mTOR regula positivamente o fator de transcrição HIF1- α , que por sua vez aumenta a expressão de PKM2 (Q. Sun et al., 2011).

Em adição, a PKM2 interage fisicamente com o fator de transcrição HIF1- α no núcleo e ativa a transcrição de genes relacionados a glicólise, como GLUT1, lactato desidrogenase A, PDK1 e a própria PKM2 (funcionando como uma alça de realimentação estimulando a via) (J. W. Kim, Tchernyshyov, Semenza, & Dang, 2006; Semba et al., 2016). Alguns achados já evidenciaram o papel da PKM2 na modulação do sistema imune, conforme será descrito no próximo item, no entanto, os mecanismos pelos quais a PKM2 exerce sua função nessas respostas ainda não estão claros.

1.6.2. PARTICIPAÇÃO DA PKM2 NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA

A PKM2 possui basicamente duas funções: glicolítica e não-glicolítica. A alta expressão e atividade enzimática da PKM2 confere a células tumorais um fenótipo glicolítico, no qual promove a produção de energia e fluxo rápido de intermediários glicolíticos em vias colaterais para sintetizar os ácidos nucleicos, aminoácidos e lipídeos, sem a acumulação de espécies reativas de oxigênio (Alves-Filho & P?lsson-McDermott, 2016). Em relação às funções não-glicolíticas, a PKM2 pode translocar para o núcleo, onde ativa a transcrição de vários genes relacionados com efeito Warburg. Essas funções estão relacionadas com a mudança conformacional da PKM2 entre tetrâmero e dímero. A forma tetramérica está associada as seguintes funções: piruvato quinase com favorecimento do TCA; menor translocação da PKM2 para o núcleo, no qual promove a redução de transcrição de genes relacionados ao efeito Warburg; menor produção de lactato, expressão de HIF-1 α e GLUT1. O dímero, ao contrário do tetrâmero, favorece diretamente o efeito Warburg e nessas condições ocorre sua translocação para o núcleo, favorecendo a

transcrição de genes relacionados ao efeito Warburg (Alves-Filho & Palsson-McDermott, 2016; Mazurek, 2011; W. Yang & Lu, 2013).

Em relação ao sistema imune, foi evidenciado um importante papel da PKM2 nesse contexto como mediador do efeito Warburg. Os autores demonstraram que a PKM2 interage com o HIF-1 α e ativa a transcrição de enzimas relacionadas com glicólise aeróbica em macrófagos ativados (Palsson-McDermott et al., 2015). A ausência de PKM2 e genes relacionados com a glicólise diminui uniformemente a produção de lactato e liberação do mediador inflamatório HMGB1. Da mesma forma, um potente inibidor da PKM2, shikonin, reduz os níveis séricos de lactato sérico e HMGB1, associando a uma proteção de camundongos em modelo experimental de endotoxemia e sepse letal (L. Yang et al., 2014). Esses dados sugerem fortemente um novo mecanismo para o controle metabólico no sistema imune, através da PKM2, possibilitando essa enzima como alvo para a regulação do sistema imunológico. Além disso, o mesmo grupo demonstrou ainda que PKM2 é capaz de ativar os inflamassomas NLRP3 e AIM2, sensores da imunidade inata. Esses complexos funcionam como plataformas para ativação de caspase-1 ou -11 e secreção de citocinas inflamatórias (ex. IL-1 β e IL-18), as quais são amplamente produzidas por macrófagos durante a sepse (Xie et al., 2016).

A participação da PKM2 também foi demonstrada em pacientes com doença arterial coronariana. A aterosclerose formada pela deposição de colesterol é considerada uma síndrome inflamatória crônica, caracterizada pela migração de monócitos para o espaço subendotelial. O trabalho demonstra que o elevado consumo de glicose pelos macrófagos, importante célula presente na doença, está relacionado com aumento da produção de ROS, causando a

dimerização da PKM2. Sendo assim, a PKM2 dimérica atuou como proteína quinase foi capaz de fosforilar STAT3 no resíduo Y705. O aumento da atividade transcricional de STAT3 em macrófagos potencializa a produção de citocinas inflamatórias IL-6 e IL-1 β , envolvidas na patogênese da aterosclerose (Shirai et al., 2016).

Os dados supra-citados sugerem fortemente um mecanismo, dependente de PKM2, para as respostas inflamatórias possibilitando essa enzima como alvo para a regulação do sistema imunológico.

Os queratinócitos, que são células-chave para o desenvolvimento da inflamação de pele durante a psoríase, apresenta a expressão de PKM2 durante sua ativação. No entanto, não existe nenhum estudo que demonstre o seu papel durante a ativação dessa célula, além disso, é importante o conhecimento dos mecanismos nos quais os KCs contribuem para a patogênese na psoríase.

Em vista do exposto, torna-se essencial um estudo que visa identificar os efeitos funcionais da PKM2, na participação da patogênese da PsO definindo os mecanismos pelo quais a PKM2 pode modificar o estado da doença. O possível envolvimento da PKM2 nos KCs, regulando o processo inflamatório, em PsO, será útil para o desenvolvimento de novas terapias para esta doença.

2. HIPÓTESE DO ESTUDO

Baseado nas informações descritas anteriormente, a hipótese do presente estudo é que a PKM2 participa da patogênese da psoríase contribuindo para o desenvolvimento e manutenção da psoríase. O possível envolvimento da PKM2 com o sistema imune e modulação do processo inflamatório na PsO é uma via inexplorada e pode ser útil ao desenvolvimento de novas terapias para esta doença.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

O presente estudo tem por objetivo avaliar o papel da PKM2 na patogênese da psoríase.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1. Caracterizar a PKM2 em amostras de pele de pacientes;

3.2.2. Avaliar o papel da PKM2 em modelos experimentais de psoríase:

Psoríase induzida por imiquimode

Modelo espontâneo transgênico K14-IL-17^{ind}

Modelo espontâneo transgênico DC-IL-17^{ind}

3.2.3. Investigar o papel da PKM2 na ativação de queratinócitos *in vivo*.

3.2.4. Investigar o papel da PKM2 na ativação de queratinócitos *in vitro*.

4. METODOLOGIA

4.1. ANIMAIS

Foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6 provenientes do biotério central da Universidade de São Paulo Campus Ribeirão Preto (USP-RP). Animais knockout condicionais K14-PKM2^{flox/+} também foram utilizados e gerados a partir do sistema Cre-LoxP de recombinação. O sistema Cre-LoxP possibilita a deleção do gene alvo em grupo específico de células por meio da inserção de sítios loxP flanqueando o gene (ou segmento), que são reconhecidos e clivados pela Cre recombinase. Nesse sentido, os animais K14-PKM2^{flox/+} foram gerados por meio do cruzamento entre camundongos Pkm2^{flox/flox} (sítios LoxP flanqueiam éxon 10) e K14-Cre (apenas os queratinócitos expressam a Cre recombinase). Esses animais foram mantidos no Biotério Departamental da Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP).

Além disso foram utilizados animais K14-IL17A^{ind+} e CD11C-IL17A^{ind/ind} (DC-IL17A^{ind}). O alelo IL-17A^{ind} permite a superexpressão condicional de IL-17A e proteína fluorescente verde (GFP) aumentada após recombinação mediada por Cre. Os animais K14-IL17A^{ind+} e CD11C-IL17A^{ind/ind} (DC-IL17A^{ind}) foram gerados pelo cruzamento entre camundongos IL-17A^{ind/ind} e K14-Cre ou CD11c-Cre (apenas os queratinócitos ou células CD11c expressam a recombinase Cre). Essas últimas construções foram realizadas em colaboração com o Prof. Dr. Ari Waisman da Universidade de Mainz, Alemanha. Todos os experimentos foram realizados em concordância com o Comitê de Ética para Animais de Experimentação (nº 167/2015) (**Anexo A**).

4.2. MODELO EXPERIMENTAL DE PSORÍASE

4.2.1. Psoríase induzida por imiquimode

Neste modelo, primeiramente, camundongos C57BL/6 ou K14-PKM2^{flox/+} foram tricotomizados na região dorsal. A seguir foram aplicados por via tópica durante 6 dias uma dose diária de 3,25 mg de imiquimode (Ixium®) no dorso de camundongos. O imiquimode é um composto imunomodulador agonista dos receptores do tipo Toll 7/8 que desempenham uma resposta inflamatória, mimetizando sinais característicos da psoríase (van der Fits et al., 2009). O escore clínico dos animais foi monitorado diariamente utilizando-se os parâmetros de espessura da pele por meio de paquímetro.

4.2.2. Modelo experimental espontâneo transgênico de psoríase K14-IL-17A^{ind/+} e DC-IL-17A^{ind}

Nestes modelos, os animais K14-IL-17A^{ind/+} e DC-IL-17A^{ind} superexpressam IL-17A, um importante mediador para o desenvolvimento da psoríase. Os queratinócitos e células CD11c são abundantes na pele e a liberação de IL-17A por essas células geram um microambiente inflamatório e o surgimento de sinais característicos da psoríase de modo espontâneo. O surgimento dos primeiros sinais característicos da psoríase ocorre aproximadamente entre 6-8 semanas de vida. Do mesmo modo que o modelo de imiquimode, o escore clínico dos animais foi monitorado diariamente utilizando-se os parâmetros de espessura da pele.

4.3. PACIENTES E INDIVÍDUOS CONTROLE

A viabilização desta parte do estudo conta com a participação de equipe médica da Divisão de Dermatologia, sob a coordenação da Profa Cacilda da

Silva Souza. Foram convidados a participar do estudo pacientes em seguimento no Ambulatório de Psoríase do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (HC-FMRP/USP). O convite foi realizado pessoalmente no horário de funcionamento dos ambulatórios. O diagnóstico da doença foi baseado em critérios clínicos e histopatológicos. Até o momento, utilizamos 4 pacientes com psoríase.

Critérios de Inclusão: **1)** pacientes com o diagnóstico clínico e histopatológico da doença; **2)** lesões em atividade; **3)** pacientes concordantes com a participação no estudo; **4)** idade maior ou igual de 18 anos; **5)** ausência de tratamentos sistêmicos.

Critérios de Exclusão: **1)** Idade menor de 18 anos; **2)** lactantes e gestantes; **3)** alergia à anestésicos locais; **4)** condição de imunossupressão por enfermidade ou uso de drogas; **5)** distúrbios de coagulação.

Os pacientes foram esclarecidos verbalmente e por escrito em texto impresso do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) acerca da proposta geral do estudo, os procedimentos para obtenção das amostras, seus riscos e benefícios. Foram assegurados da confidencialidade de seu nome e dados pessoais e da desistência de sua participação a qualquer momento sem prejuízo para o seu seguimento médico. Seguida a assinatura, os pacientes receberam uma cópia do TCLE. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HC-FMRP-USP) - CAAE 56869316.3.0000.5440 (**Anexo B**).

As amostras de pele foram coletadas por meio de biópsia cutânea realizada com punçador de 4mm, após assepsia, anestesia local. Foram coletados dois fragmentos.

4.4. FERRAMENTAS FARMACOLÓGICAS PROTOCOLOS DE TRATAMENTO

Para investigarmos o papel da PKM2 utilizamos as seguintes ferramentas farmacológicas e regimes de tratamento:

1) Experimento *in vivo*: Shikonin, SKN, inibidor da PKM2 (4 mg/Kg, i.p).

a) **Modelo de psoríase induzida por imiquimode**: início do tratamento 1 dia antes da aplicação com imiquimode e diário até o 5º dia de indução da psoríase.

b) **Modelo experimental espontâneo de psoríase transgênico K14-IL-17A^{ind/+}**: início do tratamento após o surgimento dos sinais da inflamação (8 semanas) e diariamente durante 15 dias de desenvolvimento das lesões.

c) **Modelo experimental espontâneo de psoríase transgênico DC-IL-17A^{ind/+}**: início do tratamento após o surgimento dos sinais da inflamação (8 semanas) e diariamente durante 28 dias de desenvolvimento das lesões.

2) Experimento *in vitro*: Shikonin, SKN, inibidor da PKM2 (1 e 10µM) em cultura de queratinócitos HaCAT por 24 horas concomitante a estímulos inflamatórios;

3) Experimento *in vivo*: anticorpo anti-IL17A (Novartis ®) 25 µg/g em modelo experimental espontâneo de psoríase transgênico DC-IL-17A^{ind/+} com início do tratamento após o surgimento dos sinais da inflamação (8 semanas) e a cada 3 dias durante 28 dias de desenvolvimento das lesões.

4.5. AVALIAÇÃO DA LESÃO TECIDUAL

O tecido da pele foi dissecado e divididos em cortes longitudinais, separando em dois hemisférios que foram utilizados na histologia. A coloração

de rotina Hematoxilina-Eosina (HE) foi realizada para uma observação geral das alterações histopatológicas.

4.6. IMUNOHISTOQUÍMICA

Tecido de camundongos foram fixados em uma solução de 4% de paraformol-aldeído (PFA 4%). Após fixação, o material foi acondicionado em uma solução de sacarose 30% em PBS (pH 7.4). Após esse procedimento, o tecido foi congelado em *TissueTek®* e cortado em uma espessura de 10 micrometros no criostato. A partir disso e obtivemos lâminas dos tecidos e utilizamos solução de Citrato 10 M (pH 6,0) por 30 minutos em banho maria a 90°C para recuperação antigênica. Após esse procedimento as lâminas foram lavadas e submetidas ao bloqueio da peroxidase endógena utilizando uma solução de H₂O₂ 0,5% em metanol. No passo seguinte foi realizado utilizando o kit *IHC Select® HRP/DAB* (Millipore®) no qual utilizamos sequência de bloqueio de proteínas por 20 minutos e inclusão de anticorpo primário anti-Ki67 (Abcam®) por 30 minutos. Em seguida adicionamos o anticorpo secundário por 10 minutos, o sistema de revelação Streptavidina-HRP por 10 minutos, o reagente cromógeno por 10 minutos e a contramarcacão com hematoxilina por 2 minutos. Por fim, as lâminas foram fechadas com meio de montagem *Prolong® gold anti-fade reagent* e lidas em um microscópio óptico.

4.7. IMUNOFLUORESCÊNCIA E MICROSCOPIA CONFOCAL

Tecido de camundongos e biópsia de pacientes foram fixados em uma solução PFA 4%. Após fixação, o material foi acondicionado em uma solução de sacarose 30% em PBS (pH 7.4). Após esse procedimento, o tecido foi congelado

em *TissueTek®* e cortados em uma espessura de 10 micrometros no criostato. Após os cortes e respectivo preparo da lâmina, o material foi incubado 20 minutos com para-formol-aldeído (PFA 4%). A partir desse ponto dar-se, também, o início do protocolo com as células em cultura. A seguir, as amostras foram incubadas em uma solução de PBS suplementada com Glicina (0,1M) durante 30 minutos. Outra incubação foi realizada utilizando PBS suplementado com 2% albumina bovina sérica (BSA) e 0,2 % de Triton X100 por 30 min. Nesse ponto, o anticorpo purificado anti-PKM2 e anti-K17 (1:200, Abcam) foram adicionados e mantidos *overnight* a 4°C. Após todo esse processo, o anticorpo secundário IgG goat anti-rabbit AlexaFluor 488 (1:400, Abcam) foi adicionado e incubado por 1 hora em temperatura ambiente. Por fim, as lamínulas foram introduzidas na lâmina juntamente com o meio de montagem *Prolong® gold anti-fade reagent with DAPI*. As imagens foram captadas utilizando o microscópio confocal *Axio Observer combined with LSM 800 (Carl Zeiss Microscopy)* e analisadas utilizando software *Fiji by ImageJ*.

4.8 LINHAGEM DE QUERATINÓCITOS HUMANO HACAT

HaCAT é uma linhagem celular imortalizada de queratinócitos humanos obtidas através de transformação espontânea com alta capacidade de diferenciação. Essas células foram gentilmente cedidas para esse estudo pelo laboratório da Profa. Dra. Katiuchia Uzzun Sales. As células foram expandidas e mantidas em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's (DMEM, Thermo Fisher Scientific – Waltham, MA, EUA) com alta concentração de glicose (4,5 g/L) e suplementado com soro bovino fetal 10%, penicilina (100 U/mL), L-glutamina (2mM) e gentamicina (0,2 mg/mL), a 37°C e 5% CO₂.

4.9. GERAÇÃO DA LINHAGEM HaCAT DEFICIENTE PARA PKM2: TECNOLOGIA CRISPR-CAS9

A escolha da região gênica para ser alvo da endonuclease Cas9 foi direcionada a sequência codificante do gene PKM, o responsável pela produção da PKM2 após o processo de *splicing* alternativo codificando o éxon 10 para a nossa enzima de interesse. Com base nessa sequência, sintetizamos o oligo, no qual, o mesmo foi clonado no vetor pX459 (plasmídeo #62988, Addgene), o qual contém a sequência da enzima Cas9, do gene de resistência a puromicina para posterior seleção em células de mamíferos (ambos sob o controle do mesmo promotor - U6), além do gene de resistência a ampicilina para propagação em bactéria clonados. Brevemente, o vetor px459 foi digerido pela enzima BbsI (New England Biolabs, MA, USA) durante 4 horas a 37°C. Bactérias *E.coli* DH5- α quimiocompetentes foram transformadas com o plasmídeo. As colônias obtidas pela seleção dessas bactérias em meio LB sólido (código L3522 - Sigma-Aldrich), contendo ampicilina (100 μ g/mL – InvivoGen) foram coletadas e cresceram *overnight* em meio LB líquido contendo ampicilina. No dia seguinte os plasmídeos foram purificados pelo método de MiniPrep, seguindo as instruções do fabricante (Qiagen – Hilden, Germany). Queratinócitos da linhagem HaCat foram cultivados e ressuspendidas (1-5x10⁶ células) em 100 μ l do tampão *Cell line Nucleofector Solution V*. A essa solução foi adicionado 5 μ g do plasmídeo CRISPR/PKM2 + plasmídeo repórter pMaxGFP. Essa solução foi transferida para cubetas e a eletroporação foi realizada utilizando o protocolo U-020 (Nucleofector I Device), conforme sugerido pelo fabricante. Após a transfecção, 500 μ l de meio DMEM

high glucose 10% soro fetal bovino foram imediatamente adicionados e as células foram plaqueadas. A eficiência da transfecção foi avaliada por microscopia de fluorescência, 48 horas após a transfecção, através da expressão de GFP contida no vetor controle. Essa tecnologia foi implementada em colaboração com a Dra. Nerry Tatiana Cecílio e o aluno de mestrado Gabriel Azevedo Publio, no qual desenvolveram toda metodologia para geração dessa linhagem nocaute para PKM2.

4.10. ANÁLISE DE EXPRESSÃO GENICA

A extração do RNA foi realizada utilizando o kit RNeasy Mini Kit 250 (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida, uma alíquota de 1 µl foi utilizada para determinação da concentração de RNA total, através de leitura em *NanoDrop* (Thermo Fisher Scientific) e 500 ng do RNA extraído foi utilizado para a conversão em cDNA utilizando o kit High Capacity (Life Technologies). O cDNA foi utilizado para a quantificação da expressão dos genes de interesse para humanos (*K14*, *HIF1A*, *PKM2* e *PKM1*, **tabela 1**) e camundongos (*K17*, *Lcn2*, *S100a8*, *S100a9*, *Il17a*, *Il22* e *Il36g*, **tabela 2**), e do gene de expressão constitutiva (GAPDH) por PCR em tempo real utilizando Sybr® Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific) como repórter da amplificação. A reação quantitativa em tempo real foi realizada no aparelho StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Os resultados foram analisados através do método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Tabela 1: Pares de iniciadores utilizados em humanos

Gene	Sense (5'-3')	Anti-sense (5'-3')
GAPDH	AGGGCTGCTTTTAACTCTGGT	CCCCACTTGATTTTGGAGGGA
KRT14	GGCCTGCTGAGATCAAAGACTAC	CACTGTGGCTGTGAGAATCTTGTT
HIF1A	ACCGGTACCATGGAGGGCGCCGGCGGC	ACGGGCCCCGCGTTAACTTGATCCAAAGCTC
PKM2	ATCGTCCTCACCAAGTCTGG	GAAGATGCCACGGTACAGGT
PKM1	TCACTCCACAGACCTCATGG	GAAGATGCCACGGTACAGGT

Tabela 2: Pares de iniciadores utilizados em camundongos

Gene	Sense (5'-3')	Anti-sense (5'-3')
Gapdh	CATCTTCTTGTCAGTGCCA	CGGCCAAATCCGTTTAC
II17a	GCTCCAGAAGGCCCTCAG	CTTTCCTCCGCATTGACA
II22	CAGCTCCTGTCACATCAGCGGT	AGGTCCAGTTCCCCAATCGCCT
II36g	ATGGACACCCTACTTTGCTG	TGTCCGGGTGTGGTAAACA
K17	TCCTCCAGCTCTATCAAGGGCTCC	GGTCTCAAGCATAGGAATGCTGGGG
Lcn2	CCCCATCTCTGCTCACTGTC	TTTTTCTGGACCGCATTG
S100a8	AAATCACCATGCCCTCTACAAG	CCACTTTTATCACCATCGCAA
S100a9	CAGCATAACCACCATCATCG	GTCCTGGTTTGTGTCCAGGT

4.11. ANÁLISES DE BIOINFORMÁTICA

Foi realizado uma análise de banco de dados públicos a partir de valores expressão gênica em larga escala, microarray (GSE13355) em colaboração com o Prof. Dr. Helder Nakaya da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF-USP) e o seu aluno de doutorado Diógenes Lima. Os valores foram obtidos de biópsias de pacientes com psoríase vulgar e controle saudáveis. Após isso foram retirados os efeitos de lote usando o pacote sva (J. T. Leek & Storey, 2008; Jeffrey T. Leek & Storey, 2007). Os dados foram normalizados utilizando a função Robust Multi Array Average do pacote affy (Gautier, Cope, Bolstad, & Irizarry, 2004). O controle de qualidade foi feito

utilizando o pacote array QualityMetrics do bioconductor. Os dados normalizados foram submetidos à análise de expressão diferencial com o pacote limma do bioconductor expressos de Heat Map. Um subconjunto de genes normalizados (KRT14, KRT17, LCN2 e STAT3), foram correlacionados com gene PKM utilizando a correlação de Spearman. As análises estatísticas foram feitas usando o valor de P e R.

4.12. WESTERN BLOT

Amostras de pele foram coletadas e armazenadas a -70 °C em solução contendo tampão RIPA Buffer® com inibidor de protease e fosfatase. Os tecidos foram processados com homogenizador e utilizados para dosagem de proteínas, utilizando o reagente *Bradford Reagent* (Sigma Aldrich). Volumes contendo quantidades específicas de proteína foram incubados com tampão de amostras na proporção de 1:1, a 95°C durante 10 min. Em seguida, amostras do homogenato foram separadas por eletroforese em gel acrilamida SDS-PAGE 10-12% e transferidas para membranas de nitrocelulose. Após a transferência, as membranas foram incubadas a 4°C com tampão de bloqueio, contendo PBS e leite desnatado 5% (p/v) além de Tween 20 (0,1%). Em seguida, as membranas foram lavadas com PBS e Tween 20 (0,1%) e incubadas em solução de BSA 5% e Tween 20 (0,1%) contendo anticorpo monoclonal anti-PKM2 (1:1000, Abcam). As membranas foram novamente lavadas, incubadas com anticorpo secundário por 1 h e novamente lavadas. As membranas foram reveladas com o kit de quimioluminescência (ECL, Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, U.K.), seguindo as recomendações do fabricante.

4.13. CITOMETRIA DE FLUXO

Para caracterização fenotípica das células T produtoras de IL-17 foi determinado a expressão de marcadores específicos: viabilidade celular (*ViaDye*, *Fixable Viability Dye*), CD45, CD11b, TCR $\gamma\delta$, CD3, IL-17 e IFN γ .

Para caracterização fenotípica de neutrófilos foi determinado a expressão de marcadores específicos: viabilidade celular (*ViaDye*, *Fixable Viability Dye*), CD45, CD11b, CD19, CD90.2, Ly6G, MHCII.

As células foram ressuspensas em 100 μ L de PBS com albumina bovina sérica (BSA) a 1% e incubadas com Fc block (para bloquear ligações inespecíficas) por 30 minutos a 4°C. Em seguida, as células foram marcadas com anticorpos monoclonais específicos aos marcadores determinados conjugados com diferentes fluorocromos (1:200). As células foram quantificadas através do equipamento FACS Verse e Canto II (BD Bioscience).

4.14. QUANTIFICAÇÃO DAS CITOCINAS

As concentrações das citocinas e quimiocinas (KC, TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-17, IL-22 e IL-23) foram mensuradas nos homogenatos de tecidos da pele, e sobrenadantes coletados das diferentes culturas de queratinócitos, através de ensaio imunoenzimático (ELISA), utilizando kits comerciais.

4.15. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada por ANOVA, através do Teste de Comparação Múltipla de Bonferroni e Teste *t* não paramétrico com nível de significância estabelecido em 5% (*p-value*<0,05). A análise estatística e os gráficos foram construídos utilizando o programa computacional GraphPad prism (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

5. RESULTADOS

5.1. A EXPRESSÃO DE PKM2 ESTÁ ASSOCIADA AO DESENVOLVIMENTO DA PSORÍASE EM HUMANOS

Para demonstrarmos a possível participação de PKM2 na psoríase, realizamos uma caracterização utilizando um banco de dados público *Gene Expression Omnibus* (GSE13355) que disponibilizou valores de expressão gênica de mais de 20.000 genes em biópsias de 180 pacientes divididos em 3 grupos: biópsia de indivíduos controle saudável (**Controles**), biópsia não lesionada de pacientes com psoríase (**NL**) e biópsia lesionada de pacientes com psoríase (**L**) (**Figura 3A, B**).

Inicialmente, agrupamos os principais genes presentes na via glicolítica e observamos um aumento da expressão dos genes avaliados, incluindo o gene PKM em biópsia lesionada de pacientes com psoríase em comparação a região não lesionada e pacientes controle saudáveis (**Figura 3C, D**). Em um passo seguinte, correlacionamos os valores de expressão de PKM com genes envolvidos com ativação de queratinócitos e observamos uma correlação positiva com os genes LCN2, KRT14, KRT17 e STAT3 (**Figura 3E**).

No próximo passo, realizamos um experimento avaliando a expressão de PKM2 em biópsia de pacientes com psoríase por imunofluorescência. Na região lesionada observamos uma alta expressão de PKM2 na epiderme, uma região predominada por queratinócitos, quando comparado a região não lesionada do mesmo indivíduo (**Figura 3F**). Esse dado sugere que a alta expressão de PKM2 poderia ser um marcador de lesão cutânea em pacientes com psoríase. A conclusão desse primeiro conjunto de resultados é que a PKM2 está relacionada diretamente com a psoríase e que pode desempenhar algum papel no desenvolvimento dessa doença.

Figura 3 – Caracterização da expressão de PKM2 em amostras de pacientes com psoríase. Foi utilizado banco de dados público *Gene Expression Omnibus* (GSE13355) contendo expressão gênica de biópsias de 180 pacientes divididos em 3 grupos: biópsia de controle saudável (Controles), biópsia não lesionada de pacientes com psoríase (NL) e biópsia lesionada de pacientes com psoríase (L) (**A e B**). Avaliamos a expressão gênica de genes da via glicolítica (**C**) entre eles PKM2 (**D**) correlacionando com genes relacionados a marcadores de ativação de queratinócitos, *LNC2*, *KRT14*, *KRT17*, *STAT3* (**E**). Biópsias de pacientes (Representativo de 4 pacientes) da região lesionada e região não lesionada foram submetidas a cortes histológicos e protocolo de imunofluorescência onde foi marcado PKM2 (vermelho) e núcleo celular (DAPI, azul) (**F**). As imagens foram captadas utilizando o microscópio confocal *Axio Observer* acoplado ao sistema multifoton *LSM 800* (Carl Zeiss Microscopy) e analisadas utilizando software *Fiji by ImageJ*. Os gráficos representam a média $\pm$ SEM. * $P < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa. Barra de escala 100 μ m.

5.2. A EXPRESSÃO DE PKM2 ESTÁ ELEVADA EM MODELOS DE PSORÍASE EXPERIMENTAL

Do mesmo modo que em pacientes, realizamos uma caracterização da expressão de PKM2 em pele de camundongos submetidos a modelos experimentais de psoríase. Primeiramente, utilizamos o modelo de psoríase induzido por imiquimode. Esse modelo consiste na aplicação tópica de imiquimode que, como descrito acima, é um imunomodulador ligante dos receptores TLR7/8 que mimetiza o desenvolvimento das lesões cutâneas semelhante ao observado em humanos apresentando resposta inflamatória característica dependentes do eixo IL-23/IL-17 (**Figura 4A**).

Nesse ponto observamos o desenvolvimento de lesões na pele após 6 dias de tratamento com imiquimode e aumento da espessura da pele (**Figura 4B, C, D**). Além disso, notamos uma proliferação de queratinócitos conotada pelo aumento da expressão de Ki67 (**Figura 4E**) e, por fim, observamos a ativação dessas células pelo aumento da expressão de queratina 17 (K17) (**Figura 4F**).

O próximo passo, após indução de psoríase por imiquimode observamos uma alta expressão de PKM2 na pele de camundongos, comparados aos animais controle, e que essa expressão se concentra nos queratinócitos, que são situados na epiderme (**Figura 5**).

Figura 4 – Modelo de psoríase induzida por imiquimode. Animais C57/BL6 (n=5 por grupo) foram tratados topicamente com imiquimode (IMQ) durante 6 dias **(A)** e, após isso, observamos o surgimento de lesões características **(B)** e a espessura da pele dos camundongos. Em seguida amostras de pele foram coletadas e submetidas a cortes histológicos seguido de protocolo de coloração por H&E **(D)** e imunohistoquímica para avaliarmos a proliferação de queratinócitos por Ki67 **(E)**. Por fim, utilizamos novamente amostras de pele e realizamos ensaio de imunofluorescência onde foi marcado K17 (verde) e núcleo celular (DAPI, azul). As imagens foram captadas utilizando o microscópio confocal Axio Observer acoplado ao sistema multifoton LSM 800 (Carl Zeiss Microscopy) e analisadas utilizando software Fiji by ImageJ. Os gráficos representam a média $\pm$ SEM. *P <0,05 indica diferença estatisticamente significativa. Barra de escala 100 μ m.

Figura 5 – Expressão de PKM2 em psoríase experimental induzida por imiquimode. Animais C57BL/6 foram submetidos ao modelo de psoríase induzido por imiquimode durante 6 dias e, após esse procedimento, amostras de pele foram coletadas e submetidas ao ensaio de Western Blot para expressão de PKM2 (Representativo de 5 animais por grupo) **(A)**. Além disso, cortes histológicos (Representativo de 5 animais por grupo) foram utilizados para protocolo de imunofluorescência onde foi marcado PKM2 (vermelho) e núcleo celular (DAPI, azul). As imagens foram captadas utilizando o microscópio confocal *Axio Observer* acoplado ao sistema multifoton *LSM 800* (Carl Zeiss Microscopy) e analisadas utilizando software *Fiji by ImageJ*. Barra de escala 100 μ m.

Complementando a caracterização da expressão da psoríase em modelos experimentais, utilizamos o modelo K14-IL17^{ind} (**Figura 6A, B**). Esse modelo consiste na superexpressão da citocina IL-17A nos queratinócitos como descrito em Materiais e Métodos.

A IL-17A é uma citocina muito importante para a patogênese da psoríase e o seu alvo principal são os queratinócitos. Como dito na introdução deste trabalho, os queratinócitos possuem expressão do receptor de IL-17A e com isso há uma ativação exacerbada dessas células na pele, além de outros tecidos epiteliais (Cho, Suh, Ho Lee, Kang, & Woo, 2012). Os sinais característicos da lesão cutânea do tipo psoríase se iniciam aproximadamente com 8 semanas após o nascimento dos animais e de maneira espontânea. Nesse sentido, é observado uma intensa descamação, abcesso e ocorre o aumento da espessura da pele dos camundongos (**Figura 6C, D**). A análise por citometria de fluxo das células CD45⁻ que expressam GFP demonstra que a construção foi efetiva e que a IL-17A está sendo secretada pelos queratinócitos (**Figura 6E**). Outros efeitos são descritos durante o crescimento dos animais como, a perda de peso, o comprometimento da função cardiovascular, óssea e da mucosa intestinal. Os efeitos sistêmicos resultam na mortalidade dos animais com, aproximadamente, 14 semanas de idade (Croxford et al., 2014).

Assim como em amostras de pacientes e no modelo de psoríase induzido por imiquimode, nesse ponto, caracterizamos a expressão da PKM2 e observamos um aumento da expressão dessa enzima. A característica da expressão da PKM2 manteve-se predominante nas células da epiderme das amostras utilizadas, além de uma expressão no infiltrado de células inflamatórias da derme (**Figura 6F**).

Figura 6 – Avaliação da expressão de PKM2 em modelo de psoríase espontânea K14-IL-17^{ind}. Animais K14-IL-17^{ind} (n=3 animais por grupo) foram gerados (**A,B**) e após 10 semanas foi avaliado as lesões cutâneas (**C**) e espessura da pele dos camundongos (**D**). Células da pele CD45⁺GFP⁺ foram caracterizadas por citometria de fluxo para validação do modelo (**E**). Cortes histológicos do dorso foram utilizados para imunofluorescência onde foi marcado PKM2 (vermelho) e núcleo celular (DAPI, azul). As imagens foram captadas utilizando o microscópio confocal Axio Observer acoplado ao sistema multifotom LSM 800 (Carl Zeiss Microscopy) e analisadas utilizando software Fiji by ImageJ. Os gráficos representam a média ± SEM. *P <0,05 indica diferença estatisticamente significativa. Barra de escala 100 µm.

O conjunto desses dados, demonstra que a PKM2 está aumentada na pele de camundongos submetidos a psoríase experimental e, além disso, esses dados corroboram os experimentos iniciais com amostras de pacientes. Com isso, é possível aprofundarmos o trabalho em estudos sistêmicos e mecanísticos para avaliarmos o papel da PKM2 na patogênese da psoríase.

5.3. A INIBIÇÃO DE PKM2 ATENUA O DESENVOLVIMENTO DA PSORÍASE EXPERIMENTAL

Com objetivo de avaliar, de fato, o papel da PKM2 na psoríase utilizamos uma ferramenta farmacológica, o Shikonin (SKN), um inibidor específico dessa enzima, para observamos se a psoríase é revertida e, assim, obtermos os primeiros indícios que a PKM2 desempenha um papel no desenvolvimento da psoríase. Para validar nossa ferramenta farmacológica realizamos uma análise de química computacional, em colaboração com o Prof. Dr. Carlos Tomich da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP), para avaliarmos a interação do SKN sob a enzima PKM2. Nesse sentido, confirmamos que o SKN atua sobre a enzima de modo seletivo, que prediz que esse composto é um potencial inibidor para a enzima PKM2 (**Figura 7A**). Apesar de poucos estudos demonstrando a seletividade do SKN para enzima, existe um estudo que demonstra que esse composto inibe atividade da PKM2 sem, no entanto, alterar a atividade isoforma constitutiva PKM1.

O passo seguinte, utilizamos o modelo de psoríase induzida por imiquimode, modelo que mimetiza a psoríase em camundongos C57BL/6, para avaliar a contribuição da PKM2 no desenvolvimento da resposta imune efetora. Para isso, os animais receberam 1 dose diária de SKN sistêmica (4 mg/kg, i.p), iniciada um dia antes da aplicação com imiquimode e continuada até o 5º após a indução da psoríase (**Figura 7B**).

Os camundongos submetidos à indução da psoríase apresentaram uma acentuada acantose, caracterizado pelo aumento da espessura da epiderme, e marcante eritema e descamação ao longo do desenvolvimento da doença. Animais tratados com SKN apresentaram um menor desenvolvimento da

psoríase comparado aos animais que receberam veículo, com redução dos parâmetros clínicos da doença: espessura da pele, eritema e descamação **(Figura 7C, D)**. Por fim, análises histopatológicas confirmaram que os animais tratados com inibidor de PKM2, de fato, apresentaram um menor desenvolvimento da psoríase, caracterizado por menor acantose, lesão tecidual e menor infiltrado celular **(Figura 7E, F)**.

Figura 7 – Efeito do SKN, inibidor de PKM2, no desenvolvimento da psoríase induzida por imiquimode. Análise de *docking* molecular da enzima PKM2 e seu ligante shikonin (SKN) **(A)**. Animais C57BL/6 (n=5 animais por grupo) foram submetidos ao modelo de psoríase induzido por imiquimode durante 6 dias **(B)** e um grupo de animais foram tratados com inibidor de PKM2, Shikonin (IMQ+SKN) e avaliado o desenvolvimento de lesões **(C)** e espessura da pele **(D)**. A seguir, amostras de pele foram coletadas e submetidas a cortes histológicos seguido de protocolo de marcação por H&E **(E)** e avaliado a espessura da epiderme **(F)**. Os gráficos representam a média $\pm$ SEM. *P <0,05 indica diferença estatisticamente significante. Barra de escala 100 μ m.

Para expandir o conhecimento sobre o papel da PKM2 na psoríase, utilizamos o SKN no modelo transgênico e espontâneo de psoríase K14-IL-17A^{ind}. Nesse ponto, o tratamento foi terapêutico, ou seja, iniciamos o tratamento após o desenvolvimento dos sinais da psoríase com início na 8ª semana de idade e continuando 15 após o primeiro tratamento **(Figura 8A)**. Utilizamos a dose de 4 mg/kg, i.p e observamos uma redução na lesão da pele dos animais e uma redução na espessura da pele **(Figura 8B, C)**.

O conjunto dos dados descritos acima nos traz importantes informações para o entendimento do papel da PKM2 no contexto da psoríase. Anteriormente, demonstramos que existe o aumento da expressão da enzima PKM2 após a inflamação e que, agora, a sua inibição resultou na redução de forma expressiva o desenvolvimento da psoríase experimental. Ou seja, o aumento da expressão de PKM2 desempenha um papel na doença. Com isso, a PKM2 contribui para o desenvolvimento da psoríase experimental e os próximos passos deste estudo foi tentar entender de que forma a PKM2 contribui para a resposta inflamatória.

Figura 8 – Participação da PKM2 durante o desenvolvimento da psoríase espontânea K14-IL-17^{ind}. Animais K14-IL-17^{ind} com 8 semanas (n=3 animais por grupo) de idade foram tratados com Shikonin (SKN 4 mg/kg, i.p), inibidor da PKM2, durante 15 dias **(A)**. Avaliamos a lesão tecidual **(B)** e a espessura da pele **(C)** após o tratamento com SKN. Os gráficos representam a média $\pm$ SEM. *P < 0,05 indica diferença estatisticamente significativa.

5.4. O TRATAMENTO COM SHIKONIN, INIBIDOR DE PKM2, PROMOVE REDUÇÃO DE FATORES ASSOCIADOS A ATIVAÇÃO DE QUERATINÓCITOS EM MODELO DE PSORÍASE INDUZIDA POR IMIQUIMODE

Nosso próximo passo foi caracterizar a presença marcadores associados ao desenvolvimento da psoríase. Sendo assim, verificamos como estaria a expressão de mediadores durante ativação de queratinócitos após tratamento com inibidor de PKM2 que foram submetidos ao modelo de imiquimode.

O resultado observado foi a redução da expressão gênica de *K17*, *Lcn2*, *S100a8* e *S100a9* avaliados por qPCR após tratamento sistêmico com SKN quando comparado ao grupo que recebeu o veículo (**Figura 9A**). Nesse protocolo experimental tratamos os animais com imiquimode somente por 2 dias onde temos os valores máximos de expressão gênica desses marcadores, de acordo com dados prévios do nosso laboratório. Esses marcadores são bem descritos na literatura e estão associados com a proliferação de queratinócitos. Para confirmar os dados do qPCR, realizamos ensaio de imunofluorescência para K17, um importante marcador de ativação de queratinócitos. De fato, após indução da psoríase observamos um aumento de K17 e o tratamento com SKN promoveu uma redução da expressão dessa proteína (**Figura 9B**).

Com isso, observamos um importante efeito da inibição da PKM2: redução da ativação de queratinócitos *in vivo*. Até esse momento não sabemos se isso é um efeito direto com uma consequência de efeitos sistêmicos promovidos pelo tratamento com SKN. No entanto, esses dados sugerem que a PKM2 participa da ativação de queratinócitos.

Figura 9 – Expressão de marcadores de ativação de queratinócitos submetidos a psoríase induzida por imiquimode após inibição da PKM2. Animais C57BL/6 (n=5 por grupo) foram submetidos ao modelo de psoríase induzido por imiquimode durante 6 dias e tratados diariamente com SKN. Amostras de pele foram coletadas e submetidas a avaliação da expressão gênica de *K17*, *Lcn2*, *S100a8* e *S100a9* por qPCR **(A)**. Imunofluorescência para avaliação de K17 (verde) e núcleo celular (DAPI, azul) **(B)**. As imagens foram captadas utilizando o microscópio confocal Axio Observer acoplado ao sistema multifoton LSM 800 (Carl Zeiss Microscopy) e analisadas utilizando software Fiji by ImageJ. Os gráficos representam a média $\pm$ SEM. *P < 0,05 indica diferença estatisticamente significativa. Barra de escala 100 μ m.

5.5. A INIBIÇÃO FARMACOLÓGICA DE PKM2 REDUZ NÍVEIS DE CITOCINAS PRO-INFLAMATÓRIAS NA PELE DE CAMUNDONGOS APÓS INDUÇÃO DA PSORÍASE

A liberação de mediadores inflamatórios e a resposta imunológica celular é um fator determinante para o desenvolvimento da psoríase, principalmente devido participação de citocinas como TNF- α , IL-17, IL-6, IL-22 e IL-23. Nesse sentido, resolvemos investigar a participação de PKM2 na modulação desses mediadores que contribuem para o desenvolvimento da doença.

Primeiramente, coletamos a pele dos camundongos e após processá-las realizamos os ensaios de qPCR e ELISA para avaliarmos a produção de diversos mediadores inflamatório. Observamos que os animais tratados com SKN apresentaram uma redução significativa ($p < 0.05$) da expressão gênica de *Il17a*, *Il22* e *Il36g* comparado aos animais que receberam veículo (**Figura 10A**).

No ensaio de ELISA, observamos um efeito semelhante aos dados de Qpcr, após o tratamento com inibidor de PKM2, no entanto, outros mediadores foram avaliados. Nesse resultado observamos uma redução de KC, TNF- α , IL-17, IL-6, IL-22 e IL-23 (**Figura 10B**). Esses dados corroboram os resultados do fenótipo clínico observado no modelo experimental, uma vez que, o menor desenvolvimento da psoríase está associado com níveis reduzidos de mediadores inflamatórios.

As citocinas proinflamatórias apresentam papéis centrais no desenvolvimento e manutenção da psoríase e demonstramos que o tratamento com SKN promoveu a redução da produção de citocinas proinflamatórias na pele de camundongos com psoríase. Esses mediadores são importantes para o desenvolvimento da lesão tecidual.

Figura 10 – Efeito do SKN, inibidor de PKM2, sob a produção de mediadores inflamatórios na pele de camundongos submetidos ao modelo de psoríase induzida por imiquimode. A avaliação foi realizada em camundongos C57/BL6 tratados com SKN (4 mg/Kg, i.p.) 6 dias após indução da psoríase (n=5 animais por grupo). Amostras de pele foram coletadas e processadas para quantificação da expressão gênica de *Il17a*, *Il22* e *Il36g* por qPCR (**A**) e mensuração dos níveis de KC, TNF- α , IL-17, IL-6, IL-22 e IL-23 (**B**) por ELISA. Os gráficos representam a média $\pm$ SEM. *P < 0,05 indica diferença estatisticamente significativa.

5.6. O INIBIDOR DE PKM2, SHIKONIN, REDUZ A FREQUÊNCIA E NÚMERO DE CÉLULAS PRODUTORAS DE IL-17 NA PELE APÓS INDUÇÃO DE PSORÍASE POR IMIQUIMODE

Em relação ao fenótipo celular, avaliamos, células TCR $\gamma\delta$ produtoras de IL-17 (células $\gamma\delta$), células T $\alpha\beta$ produtoras de IL-17 (Th17) na pele de camundongos após indução de psoríase por imiquimode. Como visto na introdução desse trabalho, essas células são críticas para o desenvolvimento e manutenção da psoríase e a produção da IL-17A resulta em na ativação de queratinócitos (Cho et al., 2012; Elloso, Gomez-Angelats, & Fourie, 2012; Tonel & Conrad, 2009).

Utilizamos uma estratégia de *gate* para selecionarmos as populações de linfócitos produtores de IL-17A de maneira mais seletiva possível. Sendo assim, utilizamos células totais da pele e selecionamos células CD45⁺CD11b⁻ viáveis. Nesse sentido, utilizamos leucócitos totais excluindo células mielóides, uma vez que as populações de interesse são de origem linfoide (**Figura 11**).

Figura 11 – Estratégia de gate para avaliação de células T produtoras de IL-17A por citometria de fluxo. Animais C57BL/6 (n=5 animais por grupo) foram submetidos ao modelo de psoríase induzido por imiquimode durante 6 dias. Amostras de pele foram coletadas e submetidas ao ensaio de citometria de fluxo. Para leucócitos totais utilizamos o marcador CD45, para viabilidade celular a probe *ViaDye* e para células mielóides CD11b. Selecionamos células CD45⁺ viáveis e excluimos a população de células mielóides para determinamos a frequência de células T produtoras de IL-17A.

Em nosso próximo passo, após a seleção da população de leucócitos e exclusão de células mielóides, verificamos a presença de 3 populações distintas: $\gamma\delta^{\text{high}}\text{CD3}^+$, $\gamma\delta^{\text{low}}\text{CD3}^+$ e $\gamma\delta^-\text{CD3}^+$. As células $\text{T}\gamma\delta^{\text{high}}\text{CD3}^+$ são as células que estão confinadas na epiderme da pele e as células $\text{T}\gamma\delta^{\text{low}}\text{CD3}^+$ são células que estão localizadas na derme. Esta última é a população de células $\text{T}\gamma\delta$ são as que apresentam maior produção de IL-17A na pele e combinado as suas subunidades V δ 4 e V γ 4 torna essa a seleção mais específica para esse subtipo que produz IL-17A. Nesse sentido, utilizamos o fenótipo $\text{TCR}\gamma\delta^{\text{low}}\text{CD3}^+\text{V}\delta 4^+\text{V}\gamma 4^+$ para células $\gamma\delta^+$ produtoras de IL-17A e $\text{TCR}\gamma\delta^-\text{CD3}^+$ para células $\alpha\beta^+$ produtoras de IL-17A (**Figura 12A**).

O resultado obtido após indução da psoríase por imiquimode é que houve uma redução da frequência de IL-17A produzida tanto por células T $\gamma\delta^+$ (**Figura 12C, E**) quanto por células T $\alpha\beta^+$ em animais tratados com SKN (**Figura 12B, D**). Observamos um mesmo efeito quando analisamos essas células nos linfonodos, exceto as células T $\gamma\delta^+$ produtoras de IL-17A (Dados não mostrados). De fato, o fenótipo imune celular apresentou uma relação direta com os parâmetros de marcadores de proliferação celular e lesão tecidual descritos anteriormente. De maneira interessante, descartamos a participação de linfócitos produtores de IFN γ na resposta inflamatória na pele induzida por imiquimode.

A conclusão com esses resultados é que a PKM2 é importante para a produção de IL-17A por linfócitos, no entanto, vale ressaltar que nesse ponto, que por se tratar de uma abordagem farmacológica sistêmica, não sabemos se isso seria um efeito direto ou se é uma consequência de outros eventos envolvidos com a diferenciação e ativação de linfócitos produtores de IL-17.

Figura 12 – Avaliação das células T produtoras de IL-17 na pele de camundongos submetidos ao modelo de psoríase induzida por imiquimode após o tratamento com SKN. Utilizamos células totais de pele de camundongos C57BL/6 (n=5 animais por grupo) e selecionamos a população de células CD45⁺CD11b⁻ viáveis para verificarmos o efeito da inibição da PKM2 na produção de IL-17A pelas células T $\gamma\delta^+$ e T $\alpha\beta^+$. Para células T $\gamma\delta$ produtoras de IL-17A utilizamos os marcadores TCR $\gamma\delta$, e V γ 4 e V δ 4 para as subunidades respectivas a essa célula. Para células T $\alpha\beta$ excluímos células T $\gamma\delta$ (**A**). A produção de IL-17 foi comparada com a frequência de IFN γ produzidas pelas células T $\alpha\beta^+$ (**B**) e $\gamma\delta^+$ (**C**). Gráficos comparativos da frequência de IL-17A entre animais tratados com veículo (IMQ+Veh) ou shikonin (IMQ+SKN) a partir de células T $\alpha\beta^+$ (**D**) e $\gamma\delta^+$ (**E**). Os gráficos representam a média $\pm$ SEM. *P <0,05 indica diferença estatisticamente significativa.

5.7. A INIBIÇÃO DE PKM2 REDUZ RECRUTAMENTO DE NEUTRÓFILOS NA PELE APÓS INDUÇÃO DE PSORÍASE POR IMIQUIMODE

Finalmente, com intuito de caracterizar o efeito da inibição farmacológica da PKM2 pelo SKN e avançar nos mecanismos pelos quais a PKM2 contribui para o desenvolvimento da psoríase, avaliamos o recrutamento de neutrófilos para a pele por citometria de fluxo. Como visto acima, não se sabe exatamente a participação dos neutrófilos na psoríase, no entanto, essas células são recrutadas para o local da inflamação, principalmente pela secreção de quimiocinas pelos queratinócitos que são importantes para geração do ambiente inflamatório e manutenção da psoríase (Németh & Mócsai, 2012).

Para avaliarmos a população de neutrófilos utilizamos uma estratégia de *gate* para selecionarmos de modo mais seletiva possível a população de interesse. Sendo assim, utilizamos células totais da pele e selecionamos células CD45⁺CD19⁻CD90.2⁻MHCII⁻ viáveis (**Figura 13A**). Nesse sentido, utilizamos leucócitos totais excluindo células T, B e células dendríticas. Por fim, utilizamos células Ly6G⁺CD11b⁺ como fenótipo para neutrófilos.

De maneira esperada, observamos que após a inibição da PKM2, houve uma acentuada redução da frequência e o número de neutrófilos na pele (**Figura 13B, C**). Com esses resultados podemos concluir que a PKM2 é importante para o recrutamento de neutrófilos, no entanto, novamente, não sabemos se isso é um efeito direto, uma consequência da menor produção de IL-17A pelos linfócitos ou uma menor ativação dos queratinócitos dependente de IL-17A.

Figura 13 – Efeito do SKN no recrutamento de neutrófilos na pele de camundogos submetidos ao modelo de psoríase induzida por imiquimode. Animais C57BL/6 (n=5 animais por grupo) foram submetidos ao modelo de psoríase induzido por imiquimode durante 6 dias. Amostras de pele foram coletadas e submetidas ao ensaio de citometria de fluxo. Para leucócitos totais utilizamos o marcador CD45, para viabilidade celular a probe *ViaDye*, para células T CD90.2, para células B CD19, para células dendríticas MHCII e para neutrófilos Ly6G e CD11b. Selecionamos células CD45⁺ viáveis e excluímos a população de linfócitos T, B e células dendríticas (**A**). *Dotplots* representativos do recrutamento de neutrófilos - Ly6G⁺CD11b⁺ (**B**). Gráficos comparativos da frequência e número de neutrófilos entre animais tratados com veículo (IMQ+Veh) ou shikonin (IMQ+SKN) (**C**). Os gráficos representam a média ± SEM. *P <0,05 indica diferença estatisticamente significativa.

5.8. A EXPRESSÃO DE PKM2 ESTÁ ASSOCIADA A SINALIZAÇÃO DE IL-17 EM QUERATINÓCITOS

A partir desse ponto levantamos uma questão acerca dos efeitos da produção de IL-17A na pele durante a psoríase. Sabemos que a IL-17A é produzida por linfócitos T $\gamma\delta^+$ e $\alpha\beta^+$ e que a inibição farmacológica de PKM2 promoveu uma redução da produção dessa citocina. Existem diversos fatores que são importantes para a geração dessa célula, como exemplo, as citocinas TGF- β , IL-6, IL-23 e IL-1 β , produzidas por células dendríticas e queratinócitos (Coimbra et al., 2012).

Nesse ponto, utilizamos o modelo de psoríase transgênico e espontâneo que consiste na produção de IL-17A pelas células CD11c (DC-IL-17A^{ind}) (**Figura 14A, B**). As células CD11c estão abundantes na pele e a produção de IL-17A, nesse caso, é independente de células T. O alelo IL-17A^{ind} permite a superexpressão condicional de IL-17A e GFP aumentada após recombinação mediada por Cre. Por citometria de fluxo confirmamos esse genótipo com a presença de células CD45⁺GFP⁺ (**Figura 14C, D**). Em adição, a consequência da produção de IL-17 por essas células é o surgimento de lesões no dorso e na orelha com respectivo aumento da espessura da pele dessas regiões avaliadas (**Figura 14E, F**).

Após o desenvolvimento das lesões espontâneas na pele dos animais (8 semanas após o nascimento), observamos um aumento na expressão de PKM2 na epiderme e o tratamento com anticorpo neutralizante para IL-17A promoveu uma redução na expressão dessa enzima. Esse dado, apesar de associativo, sugere que a expressão de PKM2 é dependente da ativação dos receptores de IL-17 em queratinócitos.

Figura 14 – Avaliação da expressão de PKM2 em modelo de psoríase espontânea DC-IL-17^{ind}. Animais DC-IL-17^{ind} (n=4 animais por grupo) foram gerados (**A,B**). Células da pele CD45⁺GFP⁺ foram caracterizadas por citometria de fluxo para validação do modelo (**C,D**) e após 12 semanas foi observado as lesões cutâneas (**E**) e espessura da pele dos camundongos (**F**). Cortes histológicos do dorso foram utilizados para imunofluorescência onde foi marcado PKM2 (vermelho) e núcleo celular (DAPI, azul) em grupos tratados com veículo (Veh, IgG) ou anti-IL17 (Secukinumabe, 25μg/g, i.p) (**G**). As imagens foram captadas utilizando o microscópio confocal *Axio Observer* acoplado ao sistema multifotom *LSM 800* (Carl Zeiss Microscopy) e analisadas utilizando software *Fiji by ImageJ*. Os gráficos representam a média ± SEM. *P <0,05 indica diferença estatisticamente significativa. Barra de escala 100 μm.

5.9. SHIKONIN PROMOVE REDUÇÃO DA PSORÍASE EM MODELO TRANSGÊNICO E ESPONTÂNEO DC-IL17A^{ind}

A inibição da PKM2 em modelos de psoríase induzido por imiquimode e no modelo espontâneo K14-IL17A^{ind} resultou numa redução do desenvolvimento da psoríase. Em nosso próximo passo, utilizamos a mesma abordagem para confirmamos um papel da PKM2 no desenvolvimento da psoríase no modelo espontâneo DC-IL17A^{ind}. A semelhança entre os modelos experimentais utilizados nesse trabalho está na dependência da produção de IL-17A. O modelo de imiquimode tem como consequência a produção de IL-17A, no entanto, os modelos transgênicos utilizados todas as etapas até a geração de IL-17A são ultrapassadas.

De fato, como esperado, o tratamento crônico por 28 dias com SKN resultou em um menor desenvolvimento de lesões na pele e numa redução significativa ($P < 0,05$) da espessura da pele (**Figura 15A, B, C**). Os cortes histológicos corados com H&E confirmam os achados dos parâmetros clínicos, nos quais, demonstram de maneira clara que a inibição da PKM2 promoveu a redução da espessura da pele e do infiltrado de células (**Figura 15D**).

Por fim, e não menos importante, avaliamos a expressão de K17 por imunofluorescência e observamos que a inibição de PKM2 e IL-17A promoveu uma redução na expressão de K17 após o desenvolvimento da psoríase (**Figura 15E**).

Os dados desse ponto nos trazem informações importantes sobre o papel da PKM2 no desenvolvimento da psoríase. A conclusão que se pode retirar com o conjunto desses resultados é que a PKM2 é importante para o desenvolvimento da psoríase experimental e que possui funções dependentes da ativação de IL-17A em queratinócitos.

Figura 15 – Efeito do SKN, inibidor de PKM2, no desenvolvimento da psoríase espontânea DC-IL17A^{ind}. Animais DC-IL-17^{ind} (n=4 animais por grupo) com 8 semanas de idade foram tratados com Shikonin (SKN, 4 mg/kg, i.p), inibidor da PKM2, durante 28 dias **(A)**. Avaliamos a lesão tecidual **(B)** e a espessura da pele **(C)** após o tratamento com SKN. Expressão de K17, marcador de ativação de queratinócitos, por imunofluorescência em grupos tratados com anti-IL17 (Secukinumabe, 25 µg/g) e SKN. Os gráficos representam a média ± SEM. *P <0,05 indica diferença estatisticamente significativa.

5.10. O TRATAMENTO CRÔNICO COM INIBIDOR DE PKM2 PROMOVE MENOR RECRUTAMENTO DE NEUTRÓFILOS NA PELE APÓS DESENVOLVIMENTO ESPONTÂNEO DE PSORÍASE UTILIZANDO CAMUNDONGOS DC-IL17A^{ind}

Como relatado na introdução desse trabalho, uma das várias consequências da ativação dos queratinócitos é a produção de mediadores para ativar várias células, como macrófagos, células dendríticas e, especialmente, a produção de quimiocinas para o recrutamento de neutrófilos. Um dos principais ativadores dos queratinócitos é a IL-17A. Sabendo-se que esse o modelo DC-IL17A^{ind} é dependente da produção de IL-17A e que este contribui para a ativação de queratinócitos, o nosso objetivo foi avaliar se a PKM2 pode contribuir para o recrutamento de neutrófilos mediado pela ativação de IL-17A em queratinócitos.

De forma semelhante com o modelo de imiquimode, avaliamos o recrutamento de neutrófilos por citometria de fluxo utilizando os marcadores Ly6G⁺CD11b⁺. Para selecionarmos essa população utilizamos células CD45⁺ totais e viáveis da pele (**Figura 16A**). Assim como observado no modelo de imiquimode, o tratamento com SKN promoveu uma redução na frequência e no número de neutrófilos na pele conotado pela redução dos marcadores Ly6G⁺CD11b⁺ (**Figura 16B, C**). Visto que a PKM2 pode ser dependente da ativação de IL-17A em queratinócitos, esse resultado sugere que a PKM2 contribui para o recrutamento de neutrófilos pelos queratinócitos dependente de IL-17A.

O conjunto de resultados até o momento sugere uma relação estreita entre IL-17A, queratinócitos e PKM2, no qual, a ativação dos queratinócitos pela IL-17A é mediada por funções da PKM2. Com isso, a partir desse momento nosso foco foi tentar desvendar esse eixo utilizando abordagens *in vivo* e *in vitro*.

Figura 16 – Efeito do SKN no recrutamento de neutrófilos em modelo de psoríase espontânea DC-IL-17A^{ind}. Animais DC-IL-17^{ind} (n=4 animais por grupo) com 8 semanas de idade foram tratados com Shikonin (SKN, 4 mg/kg, i.p), inibidor da PKM2, durante 28 dias. Amostras de pele foram coletadas e submetidas ao ensaio de citometria de fluxo. Seleccionamos células CD45⁺ viáveis (**A**). Dotplots representativos do recrutamento de neutrófilos - Ly6G⁺CD11b⁺ (**B**). Gráficos comparativos da frequência e número de neutrófilos entre animais DC-IL-17^{ind} tratados com veículo (Veh) ou SKN (**C**). Os gráficos representam a média $\pm$ SEM. *P <0,05 indica diferença estatisticamente significativa.

5.11. A ATIVAÇÃO DE QUERATINÓCITOS PELA IL-17A PROMOVE AUMENTO DA EXPRESSÃO DE PKM2

Os dados obtidos nesse trabalho, até o momento, nos levaram a associar a PKM2 com funções em queratinócitos, pois, observamos vários eventos que incluem: **1)** Expressão de PKM2 está elevada e localizada em queratinócitos na pele de pacientes e de camundongos; **2)** A inibição farmacológica da PKM2 resulta em menor expressão de marcadores associados a ativação de queratinócitos e **3)** A inibição de PKM2 resulta em menor recrutamento de neutrófilos, uma vez que a principal célula responsável por isso é o queratinócito. Nesse sentido, o nosso objetivo a partir de agora é avaliar o papel da PKM2 em queratinócitos.

Primeiramente, utilizamos queratinócitos humanos da linhagem HaCAT, cultivamos, plaqueamos e estimulamos com IL-17A (**Figura 17A**). De maneira interessante, após 24 horas de estímulo com IL-17A observamos o aumento da expressão de *PKM2* e outros mediadores associados com ativação de queratinócitos, *K14* e a funções de PKM2, o *HIF1A*. Em adição, não observamos diferença na expressão de *PKM1*, a isoforma constitutiva da PKM (**Figura 17B**).

Confirmando o resultado do qPCR, por imunofluorescência, observamos o aumento da expressão de PKM2 após ativação pela IL-17A, além disso, observamos que as células foram viáveis com a concentração de IL-17A utilizada (**Figura 17C**). Além disso, em dados não mostrados, demonstramos que existe uma parte fosforilada ativa da PKM2 confinada no núcleo, durante ativação com IL-17A, sugerindo q a PKM2 possa ter função de co-fator de transcrição. No entanto, é necessárias maiores investigações sobre esse efeito.

A estimulação direta da IL-17A em queratinócitos sugere que a PKM2 possa ter um efeito direto nessas células e assim, contribuindo para o desenvolvimento e manutenção da psoríase (**Figura 17D**).

Figura 17 – Expressão de PKM2 em queratinócitos da linhagem HaCAT ativados com IL-17A *in vitro*. Células da linhagem HaCAT ($n=4$ por grupo) foram cultivadas e plaqueadas ($2,5 \times 10^5$) na presença ou não de IL-17A durante 24 horas de cultura. As células foram coletadas para avaliar expressão de *KRT14*, *HIF1A*, *PKM2* e *PKM1* por qPCR (**A**). Ensaio de imunofluorescência para PKM2 (vermelho) e núcleo (DAPI, azul) (**B**). Avaliação da viabilidade celular após estímulo com IL-17A por citometria de fluxo utilizando o marcador 7-AAD. Os gráficos representam a média $\pm$ SEM. * $P < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa. Barra de escala 10 μ m.

5.12. A INIBIÇÃO FARMACOLÓGICA *IN VITRO* DA PKM2 REDUZ A PRODUÇÃO DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS EM QUERATINÓCITOS

Para demonstrar de maneira mais clara a importância da PKM2 em queratinócitos, utilizamos o SKN em concentrações μM em células HaCAT. Estimulamos essas com IMQ $5\mu\text{g/ml}$ e IL-17A 100ng/ml frente a duas concentrações de SKN (1 e $10\mu\text{M}$) utilizadas concomitante aos estímulos e avaliamos, por ELISA, a produção de TNF- α e IL-8, após 24 horas (**Figura 18A**).

No resultado obtido observamos o aumento de TNF- α e IL-8 após estimulação com IMQ e IL-17A e a inibição da PKM2 foi capaz de reduzir os níveis das citocinas avaliadas, no qual sugere que a PKM2 contribui para a ativação de queratinócitos (**Figura 18B**).

Uma observação importante é que a IL-17A em comparação ao IMQ não produz concentrações diferentes de TNF- α , no entanto, quando se avalia a IL-8 observamos uma produção aproximadamente 5 vezes maior quando estimulamos as células com IL-17A, sugerindo que a IL-17A seja o mediador principal na produção de IL-8 pelos queratinócitos para o recrutamento de neutrófilos (**Figura 18C**).

Figura 18 – Efeito do SKN, inibidor de PKM2, em queratinócitos da linhagem HaCAT ativados *in vitro*. Células da linhagem HaCAT ($n=4$ por grupo) foram cultivadas, plaqueadas ($2,5 \times 10^5$) e estimuladas com imiquimode (IMQ, 5 µg/ml) ou IL-17A (100 ng/ml) na presença ou não de SKN (5 e 10 µM) durante 24 horas de cultura (**A**). Sobrenadante das células foi coletado e realizado ensaio para ELISA para avaliar produção de TNF- α e IL-8 (**B**). Produção de TNF- α e IL-8 pelas células HaCAT estimuladas com imiquimode (IMQ, 5 µg/ml) e IL-17A (100 ng/ml). Os gráficos representam a média $\pm$ SEM. *P < 0,05 indica diferença estatisticamente significativa.

5.13. O SILENCIAMENTO GÊNICO DA ENZIMA PKM2 EM QUERATINÓCITOS, UTILIZANDO TECNOLOGIA CRISPR-CAS9, INIBE A PRODUÇÃO DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS

O objetivo desse tópico foi utilizar uma construção de deleção genética específica para PKM2 para que pudéssemos validar a ferramenta farmacológica e entendermos qual o papel da PKM2 em queratinócitos. Utilizamos uma importante tecnologia padronizada em nosso laboratório, o CRISPR/Cas9, para geração de queratinócitos HaCAT nocautes para enzima PKM2.

Primeiramente, observamos que, as células controles que não foram transfectadas (**NT**) com o plasmídeo CRISPR/PKM2 apresentavam banda única, com características correspondentes ao peso molecular da proteína PKM2 (peso molecular de 58 kDa), por outro lado, as células que foram transfectadas não apresentaram nenhuma banda com as mesmas características, indicando o sucesso obtido na deleção do gene da PKM2. Além disso, ao revelarmos a mesma membrana utilizando anticorpo anti-PKM1, observamos que a deleção da PKM2 foi específica, uma vez que as células nocautes para PKM2 mantinham o nível de expressão de PKM1, de maneira similar ao observado nas células controles (**Figura 19**).

Figura 19 – Geração de queratinócitos da linhagem HaCAT. Avaliação da expressão de PKM2 e PKM1 por Western Blot após geração dos clones da linhagem HaCAT transfectadas com vetor CRISPR/PKM2.

Com uma importante ferramenta em mãos, células HaCAT nocautes para PKM2 (HaCAT- Δ PKM2), realizamos o ensaio funcional por ELISA da produção de mediadores sabidamente secretados pelos queratinócitos, IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α . O resultado obtido foi a inibição da produção desses mediadores após a estimulação por 24h dessas células. A partir dos resultados desse ponto, podemos concluir que a PKM2 é crítica para a ativação de queratinócitos *in vitro* e que pode contribuir de maneira relevante para o desenvolvimento de manutenção da psoríase **(Figura 20)**.

Figura 20 – Participação da PKM2, em queratinócitos da linhagem HaCAT ativados *in vitro*. Células da linhagem HaCAT WT e Δ PKM2 (n=4 por grupo) foram cultivadas, plaqueadas ($2,5 \times 10^5$) e estimuladas com imiquimode (IMQ, 5 μ g/ml) durante 24 horas de cultura (A). Sobrenadante das células foi coletado e realizado ensaio para ELISA para avaliar produção de IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α . Os gráficos representam a média $\pm$ SEM. *P < 0,05 indica diferença estatisticamente significativa.

5.14. A ENZIMA PKM2 CONTRIBUI PARA A EXPRESSÃO DO RECEPTOR DE IL-17 EM QUERATINÓCITOS HACAT ATIVADOS

Os dados descritos acima demonstram que a PKM2 é essencial para ativação via IL-17 em queratinócitos HaCAT. Sendo assim, nosso próximo passo foi tentar entender de que forma a PKM2 poderia contribuir na ativação via IL-17R. Dessa forma, estimulamos células WT e Δ PKM2 com IL-17A durante 24h e avaliamos por imunofluorescência a expressão de IL-17R.

As células WT estimuladas com IL-17A apresentaram aumento da expressão de IL-17R em comparação com as células não estimuladas. Em adição observamos um aumento da PKM2 e observamos uma co-marcação com IL-17R. Quando analisamos as células Δ PKM2 não observamos a expressão de PKM2, confirmando a deleção da enzima em questão e observamos uma baixíssima expressão de IL-17R em comparação as células WT estimuladas **(Figura 21)**.

O conjunto desses resultados sugere que a PKM2 contribui para ativação de queratinócitos por IL-17 atuando na expressão de IL-17R e consequentemente sua sinalização. Esse dado corrobora os dados de ELISA previamente obtidos acima, no qual observados que a ausência de PKM2 resulta na menor produção de citocinas inflamatórias.

O dado de imunofluorescência nesse ponto é o início do entendimento dos mecanismos pelos quais a PKM2 contribui para a ativação, no entanto, são necessários experimentos complementares a esse ensaio, como Western Blot, qPCR e FACS para analisar a expressão do receptor de IL-17. Além desses experimentos propostos, é necessário analisar as principais vias de sinalização responsáveis pela ativação desse receptor.

Figura 21 – Papel da PKM2 na expressão do receptor de IL-17 em queratinócitos HaCAT. Células da linhagem HaCAT WT e Δ PKM2 (n=4 por grupo) foram cultivadas, plaqueadas ($2,5 \times 10^5$) e estimuladas com imiquimode (IL-17A 100ng/ml) durante 24 horas de cultura. Protocolo de imunofluorescência foi marcado PKM2 (vermelho), IL-17R (verde) e núcleo celular (DAPI, azul). As imagens foram captadas utilizando o microscópio confocal *Axio Observer* acoplado ao sistema multifoton *LSM 800* (Carl Zeiss Microscopy) e analisadas utilizando software *Fiji by ImageJ*. Barra de escala 20 μ m.

5.15. ANIMAIS DEFICIENTES PARA PKM2 EM QUERATINÓCITOS APRESENTAM MENOR DESENVOLVIMENTO DA PSORÍASE INDUZIDA POR IMIQUIMODE

Dando continuidade à investigação do eixo IL-17A/Queratinócitos/PKM2, nosso próximo passo foi investigar o papel *in vivo* da PKM2 em queratinócitos. Para isso utilizamos animais nocautes para PKM2 especificamente em queratinócitos.

Utilizamos o sistema cre-loxP de recombinação no qual utilizamos cruzamos entre animais K14-cre e PKM2^{fl/fl}. É de extrema importância descrever que não foi possível gerar animais com a deleção dos dois alelos pela cre-recombinase na K14 e não sabemos o motivo exato pelo qual não obtivemos o genótipo esperado: K14-PKM2^{fl/fl}. Geramos cerca de 10 proles pelo cruzamento entre PKM2^{fl/fl}-cre/0 e PKM2^{fl/+}-K14-cre/0, no qual certamente, obteríamos o genótipo esperado (**Figura 22A**).

Contudo, apesar do insucesso na deleção total da PKM2 em queratinócitos, utilizamos o genótipo heterozigoto K14-PKM2^{fl/+} com intuito de acharmos algum fenótipo após indução da psoríase. Como podemos observar, de maneira muito interessante, a deleção de apenas um alelo foi suficiente para suprimir a expressão de PKM2 na pele de camundongos, avaliadas por imunofluorescência e Western Blot (**Figura 22C, D**). Nesse ponto, aplicamos o imiquimode, pois a PKM2 é uma enzima que é induzida pela resposta inflamatória (**Figura 22B**).

Figura 22 – Geração de animais deficientes para PKM2 em queratinócitos. Animais K14-PKM2^{fl/+} foram gerados **(A)** e submetidos ao modelo de psoríase induzido por imiquimode durante 3 e 6 dias **(B)** e, após esse procedimento, amostras de pele foram coletadas e submetidas ao ensaio de Western Blot para expressão de PKM2 **(C)**. Além disso, cortes histológicos foram utilizados para protocolo de imunofluorescência onde foi marcado PKM2 (vermelho) e núcleo celular (DAPI, azul). As imagens foram captadas utilizando o microscópio confocal Axio Observer acoplado ao sistema multifoton LSM 800 (Carl Zeiss Microscopy) e analisadas utilizando software Fiji by ImageJ. Barra de escala 100 μ m.

Após a indução da psoríase por imiquimode, podemos observar uma redução na doença nos animais K14-PKM2^{fl/+}, principalmente na descamação, mas não no eritema. Além disso, observamos uma redução na espessura da pele desses animais **(Figura 23A, B)**.

Afim de confirmarmos os parâmetros clínicos da doença, realizamos a histologia e coloração por H&E, e observamos uma grande redução na espessura da epiderme e do infiltrado de células nos animais K14-PKM2^{fl/+} **(Figura 23C, D)**. De maneira muito clara, demonstramos que a PKM2 nos queratinócitos contribui para o desenvolvimento da psoríase experimental. No entanto, acreditamos que a deleção dos dois alelos obteríamos resultados bem mais expressivos, pois se não geração do nocaute total nessas células leva a entendermos que a PKM2 possui uma função extremamente importante nessas células. Vale ressaltar que em nosso laboratório conseguimos, com sucesso, a geração de outros nocautes pra PKM2 nas células CD4 e na linhagem mielóide (LysM) utilizando a ferramenta cre-loxP com sucesso na deleção dos dois alelos.

Figura 23 – Participação da PKM2 em queratinócitos no desenvolvimento da psoríase induzida por imiquimode. Animais K14-PKM2^{fl/+} foram submetidos ao modelo de psoríase induzido por imiquimode durante 6 dias (n=5 animais por grupo). Foi avaliado o desenvolvimento de lesões (**A**) e espessura da pele (**B**). A seguir, amostras de pele foram coletadas, submetidas a cortes histológicos seguido de protocolo de marcação por H&E (**C**) e avaliado a espessura da epiderme (**D**). Os gráficos representam a média ± SEM. *P <0,05 indica diferença estatisticamente significativa.

5.16. A DELEÇÃO GÊNICA DE PKM2 EM QUERATINÓCITOS REDUZ A PRODUÇÃO DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS APÓS PSORÍASE INDUZIDA POR IMIQUIMODE

Com a finalidade de avaliarmos os efeitos da PKM2 nos queratinócitos, utilizamos os animais K14-PKM2^{fl/+} e induzimos psoríase por imiquimode para avaliarmos a produção de mediadores inflamatórios por ELISA: KC, TNF- α , IL-1 β , IL-17 e IL-23 (**Figura 24**).

Observamos um aumento de KC, TNF- α e IL-1 β na pele dos animais PKM2^{fl/fl} e uma redução dos níveis dessas citocinas no grupo K14-PKM2^{fl/+}. Essas citocinas são sabidamente predominantemente produzidas pelos queratinócitos e que a KC é crucial para o recrutamento de neutrófilos. A citocina IL-23 teve um aumento no 3º dia, no entanto, no 6º não houve diferença nos níveis desse mediador.

De maneira intrigante, a citocina IL-17A foi significativamente ($p < 0,05$) maior no grupo K14-PKM2^{fl/+} comparado com os animais PKM2^{fl/fl} no 3º e 6º após desenvolvimento da psoríase, o que de certa forma não corrobora os parâmetros macroscópicos e histológicos avaliados. Contudo, esse dado sugere fortemente um comprometimento na sinalização do receptor da IL-17A, uma vez que animais deficientes para receptor de IL-17A (IL-17R^{-/-}) apresentam uma redução na doença, porém uma produção elevada de IL-17A, uma vez que a IL-17A não tem o seu sítio de ligação e acaba se acumulando na pele (Dados não mostrados).

Esses resultados sugerem que a PKM2 contribui para a ativação de queratinócitos *in vivo* e que o mecanismo pode estar associado a sinalização do receptor para IL-17.

Figura 24 – Participação da PKM2 em queratinócitos na produção de mediadores inflamatórios na pele de camundongos submetidos a psoríase induzida por imiquimode. Animais K14-PKM2^{flox/+} foram submetidos ao modelo de psoríase induzido por imiquimode durante 3 e 6 dias (n=5 animais por grupo). Amostras de pele foram coletadas para dosagem dos níveis de TNF- α , IL-1 β , IL-17e IL-23. Os gráficos representam a média $\pm$ SEM. *P < 0,05 indica diferença estatisticamente significativa.

5.17. A AUSÊNCIA DE PKM2 EM QUERATINÓCITOS PROMOVE A REDUÇÃO DE RECRUTAMENTO DE NEUTRÓFILOS NA PELE DE CAMUNDONDOS APÓS INDUÇÃO DA PSORÍASE (FIG. 22)

Uma das consequências finais para a ativação de queratinócitos é o recrutamento de neutrófilos, com isso, nosso objetivo final foi avaliar o recrutamento de neutrófilos na pele após a indução da psoríase por imiquimode em animais K14-PKM2^{fl/+}.

Utilizamos novamente o fenótipo celular Ly6G⁺CD11b⁺ para caracterizarmos a população de neutrófilos na pele a partir de células totais CD45⁺ viáveis (**Figura 25A**). Investigamos o dia 3 e o dia 6 após indução da psoríase por imiquimode e observamos uma redução significativa ($P < 0,05$) do número de neutrófilos no grupo K14-PKM2^{fl/+} em comparação ao grupo PKM2^{fl/fl} (**Figura 25B**).

Finalmente, a conclusão desse conjunto de dados é que a PKM2 nos queratinócitos é essencial para o recrutamento de neutrófilos pelos queratinócitos após indução da psoríase. Além disso, baseado em experimentos *in vitro* com queratinócitos e IL-17A e, sabendo que a IL-17A é essencial para o desenvolvimento da psoríase por imiquimode, podemos sugerir que a IL-17A ativa queratinócitos através do receptor IL-17R e a PKM2 atua direta ou indiretamente na sinalização desse receptor para produção de mediadores inflamatórios e consequentemente recrutamento de neutrófilos para o desenvolvimento e manutenção da psoríase.

Figura 25 – Participação da PKM2 no recrutamento de neutrófilos na pele de camundongos submetidos ao modelo de psoríase induzida por imiquimode. Animais K14-PKM2^{fl/+} foram submetidos ao modelo de psoríase induzido por imiquimode durante 3 e 6 dias (n=5 animais por grupo). Amostras de pele foram coletadas e submetidas ao ensaio de citometria de fluxo. Selecionamos células CD45⁺ (A). Dotplots representativos do recrutamento de neutrófilos - Ly6G⁺CD11b⁺ (B). Gráficos comparativos da frequência e número de neutrófilos entre animais PKM2^{fl/fl} e K14-PKM2^{fl/+} submetidos ao modelo de psoríase induzido por imiquimode durante 3 e 6 dias (C). Os gráficos representam a média $\pm$ SEM. *P <0,05 indica diferença estatisticamente significante.

6. DISCUSSÃO

Os fármacos utilizados atualmente na terapêutica da psoríase são, em certos casos, pouco eficientes pois dirigem-se, sobretudo, para as manifestações inflamatórias crônicas sem de fato atuarem em sua causa. Isto ocorre principalmente devido ao entendimento limitado da maneira exata pela qual ocorre o desenvolvimento dessa doença. Além disso, é de fundamental importância a identificação de potenciais biomarcadores que podem auxiliar no diagnóstico, prognóstico e tratamento da psoríase. Nesse contexto, nós demonstramos através de uma abordagem experimental um possível mecanismo fisiopatológico responsável pelo desenvolvimento da psoríase: a participação da enzima PKM2. Nesse sentido, demonstramos, pela primeira vez, que a expressão da PKM2 está elevada na pele durante resposta inflamatória da psoríase, especialmente em queratinócitos, e sua inibição farmacológica ou genética conferiu uma acentuada redução nos aspectos inflamatórios observados.

Diversos estudos têm atribuído um papel da PKM2 na regulação da resposta inflamatória, principalmente durante a ativação *in vitro* em macrófagos, no qual, de maneira geral, é demonstrado que a PKM2 está aumentada com estímulo com LPS e que sua inibição atenua a produção de mediadores inflamatórios (Palsson-McDermott et al., 2015; Wen, Ting, & O'Neill, 2012; L. Yang et al., 2014).

No contexto de doenças inflamatórias, de maneira similar aos nossos dados, autores demonstram que a PKM2 está associada a produção de HMGB1 durante a sepse experimental e que sua inibição é importante para o controle da inflamação e aumento da sobrevivência dos animais (L. Yang et al., 2014). Além disso, em contexto de doença cardiovascular é demonstrado o aumento de

PKM2 em macrófagos encontrados na lesão vascular de pacientes com aterosclerose e que a inibição da PKM2 *in vitro* dessas células promoveu a redução da produção de IL-6, que está associada com desenvolvimento do quadro inflamatório da aterosclerose (Shirai et al., 2016). Em adição, outro trabalho demonstrou o aumento de PKM2 em pacientes com doença inflamatória intestinal (Almousa, Morris, Fowler, Jones, & Alcorn, 2018). Corroborando estes dados, demonstramos um papel da PKM2 na resposta inflamatória e, pela primeira vez, no contexto de autoimunidade. Neste trabalho, observamos o papel essencial dessa enzima no desenvolvimento da psoríase e em outros estudos do nosso grupo, foi demonstrado um papel crítico durante a encefalomielite autoimune experimental.

As citocinas próinflamatórias apresentam papéis centrais no desenvolvimento e manutenção da psoríase. Alguns trabalhos têm demonstrado um papel central da IL-23 e IL-17, no qual estão intimamente interligadas. A IL-23 contribui diretamente para ativação e diferenciação de células T que produzem IL-17A, que por sua vez apresentam funções efetoras em células como, ativação dos queratinócitos (Di Cesare et al., 2009; Elloso et al., 2012; Nogales et al., 2008). Demonstramos a PKM2 está associada com o desenvolvimento da lesão na pele de pacientes com psoríase e em 3 modelos experimentais de psoríase: imiquimode, K14-IL17^{ind} e DC-IL-17^{ind}. A similaridade entre esses grupos experimentais está na participação crítica da citocina IL-17, no qual é observado o aumento de IL-17 e que sua inibição resulta na redução da doença. De forma interessante, observamos que todas as amostras de pele analisadas a expressão PKM2 está confinada nos queratinócitos, a principal célula efetora da produção de IL-17, que possui uma elevada expressão do seu

receptor IL-17R. Em adição, amostras de pacientes analisadas apresentam uma correlação positivas entre o gene *PKM* e genes associados com a ativação de queratinócitos *LNC2*, *KRT14*, *KRT17* e *STAT3*.

Em modelo de psoríase induzida por imiquimode observamos um aumento da expressão de genes associados com ativação de queratinócitos *K17*, *Lcn2*, *S100a8* e *S100a9*. Além disso, observamos um aumento da expressão proteica de K17 tanto no modelo de imiquimode, quanto nos modelos de psoríase espontânea K14-IL-17A^{ind} e DC-IL-17^{ind}. Todos esses marcadores, de fato, estão associados com a expressão de PKM2 e demonstramos que o tratamento com Shikonin (SKN), inibidor de PKM2, promoveu a redução da doença e desses marcadores, sugerindo que essa enzima contribui de alguma forma para ativação de queratinócitos. Autores têm demonstrado que a expressão de K17 em queratinócitos *in vitro* é dependente da ação direta da IL-17 (X. Shi et al., 2011), além disso, é demonstrado que tratamentos farmacológicos ou a geração de nocautes para vias que culminam na redução do desenvolvimento da psoríase experimental estão intimamente relacionadas aos marcadores *K17*, *Lcn2*, *S100a8* e *S100a9* (Kjær, Thorsen, Jessen, Stenderup, & Pedersen, 2015; J. Sun, Zhao, & Hu, 2013; Works et al., 2015; R. Yang et al., 2013).

Em um passo seguinte, observamos o aumento de citocinas inflamatórias na pele de animais submetidos ao modelo de psoríase induzida por imiquimode, como KC, TNF- α , IL-17, IL-22, IL-23 e IL-36g. Esses mediadores são os que mais estão associados com a doença. Porém, de uma maneira geral, a maioria dos mediadores inflamatórios estão aumentados com o desenvolvimento da psoríase possuindo funções específicas na doença

(Coimbra et al., 2012). Analisamos por ELISA (Milliplex) mais de 30 tipos de citocinas inflamatórias e observamos que a grande maioria está elevada na pele desses camundongos (Dados não mostrados). Basicamente, o nosso objetivo nesse ponto foi avaliar o efeito da inibição da PKM2 em resposta ao aumento de citocinas durante a psoríase e, de fato, confirmamos que o SKN foi capaz de inibir diversas citocinas.

Sendo assim, a redução das lesões observadas nos modelos experimentais, redução de marcadores de ativação queratinócitos e redução de mediadores inflamatórios após tratamento com SKN confirmam que a PKM2 apresenta um papel essencial no desenvolvimento da psoríase. Já é bem descrito o papel desses mediadores na psoríase e estão sendo desenvolvidos medicamentos que neutralizam especificamente estas citocinas como: os anti-TNF (Etanercepte), IL-23 (Ustekinumabe) e IL-17 (Secukinumabe) (Christopher E.M. Griffiths et al., 2010; Langley et al., 2014; Leonardi et al., 2003).

A PKM2, como visto nesse trabalho, está associada aos aspectos clínicos da psoríase, presença de moléculas que contribuem para o desenvolvimento da doença e a sua inibição se demonstrou eficaz na doença experimental. Complementando o fenômeno observado, avaliamos a presença de células produtoras de IL-17A, chave para o desenvolvimento da doença. De fato, observamos que o SKN reduziu a frequência dessas células, tanto células T $\alpha\beta$ quanto células T $\gamma\delta$ produtoras de IL-17 na pele após indução da psoríase, corroborando os fenótipos “clínicos” observados até o momento. Inúmeros trabalhos têm focado no entendimento da função dessas células e, inclusive, objetivo inicial desse projeto foi estudar o papel da PKM2 nas células produtoras de IL-17 durante a psoríase, entretanto, vários indícios nos levaram

a acreditar que a PKM2 poderia ter um efeito importante nos queratinócitos, incluindo: a expressão massiva da PKM2 em queratinócitos, a redução de marcadores associados a ativação de queratinócitos e a redução do recrutamento de neutrófilos com a inibição da PKM2.

O papel dos neutrófilos na psoríase é incerto, no entanto, acredita-se que nessa doença ele tenha um papel essencial na manutenção do ambiente inflamatório. É descrito que pacientes apresentam elevado número de neutrófilos circulantes em um estado severo de psoríase (Ikeda et al., 2013). Outro grupo demonstrou que a inibição direta com anticorpo anti-Ly6G em modelo de imiquimode resultou em uma redução drástica do *score* observado (Sumida et al., 2014). Além disso, houve uma redução do acometimento de lesões em pacientes com psoríase pustular submetidos a uma deleção específica de neutrófilos por aférese adsorativa (Ikeda et al., 2013). Corroborando estes dados, o tratamento com SKN em nosso trabalho resultou na redução do número de neutrófilos para a pele inflamada. Vale ressaltar que o recrutamento dessas células para o local da inflamação é realizado principalmente pela liberação de quimiocinas pelos queratinócitos (Giustizieri et al., 2001; Shirakata, 2010; Yoshizumi et al., 2008) e corroborando esses dados, observamos uma redução na produção de KC, importante quimiocina para recrutamento de neutrófilos.

A IL-17 é produzida, predominantemente, por células T $\alpha\beta$ e T $\gamma\delta$, no entanto, utilizamos duas interessantes abordagens experimentais: a utilização de camundongos que produzem IL-17 através dos queratinócitos (K14-IL-17^{ind}) ou células CD11c (DC-IL-17^{ind}). Dessa forma temos um modelo espontâneo de psoríase e que a produção de IL-17 é independente de células T.

Como descrito nesse estudo, a PKM2 está elevada na pele desses

animais após o desenvolvimento dos sinais de lesão na pele e que o tratamento com SKN reduziu a doença. Ambos os modelos são neutrofílicos, pois a IL-17 ativa fortemente os queratinócitos que participam do recrutamento dos neutrófilos para a pele e, ainda, os neutrófilos recrutados estão sendo ativados diretamente por essa citocina. De modo interessante, no modelo DC-IL-17^{ind} tratamos um grupo com anticorpo neutralizante para IL-17A e observamos a redução da expressão PKM2. Embora associativo, esse resultado sugere que a PKM2 não atua na regulação da produção de IL-17 e sim na via de sinalização do seu receptor IL-17R. Em adição, observamos que o SKN foi capaz de reduzir o recrutamento de neutrófilos na pele após sinais na pele inflamada de animais DC-IL17A^{ind}. No entanto, de maneira inesperada, não observamos a redução do número de neutrófilos em animais K14-IL-17A^{ind} (Dados não mostrados). Uma das interpretações para esse efeito é que os animais já estavam com uma doença avançada ou que o tempo de tratamento foi insuficiente para a abolição dos efeitos observados.

Com intuito de corroborar os dados *in vivo* observados, utilizamos queratinócitos da linhagem HaCAT e observamos que após ativação com IL-17A houve um aumento de PKM2 e que a expressão da parte fosforilada ativa está no núcleo dessas células. Existem dados na literatura que mostra que a ativação dessas células com um composto oxidante promove aumento de PKM2 e outros marcadores da via glicolítica (Xiao et al., 2014). Esses dados corroboram os nossos obtidos, no entanto, direcionamos os nossos experimentos no sentido de mimetizar um ambiente inflamatório durante a psoríase.

Para investigação do papel da PKM2 em queratinócitos *in vitro*, primeiramente, utilizamos o SKN nas células e avaliamos a produção de

citocinas liberadas pela HaCAT e de fato, observamos acentuada redução de TNF- α e IL-8 24 horas após IMQ ou IL-17A na presença de SKN. Uma observação interessante nesse ponto é que a produção de IL-8 promovida pela IL-17A nessas células está muito mais elevada em comparação ao estímulo com IMQ. A IL-8 é uma importante quimiocina que contribui para o recrutamento de neutrófilos (Hammond et al., 1995). Corroborando esses dados, autores demonstram que o estímulo com IL-17 em queratinócitos produz muito mais quimiocinas, incluindo IL-8, em comparação à estimulação com IL-22 ou IFN γ (Nogales et al., 2008). Atualmente existe um anticorpo neutralizante anti-IL-8 (Abcream) de uso tópico que tem se mostrado muito efetivo no controle das lesões durante a psoríase (Tsai & Tsai, 2017).

O tratamento sistêmico com inibidor de PKM2 resulta em inúmeras interpretações em relação ao papel da PKM2 na psoríase. Embora o SKN seja considerado um potente inibidor da PKM2 (J. Chen et al., 2011), seu mecanismo de inibição ainda não está totalmente claro, podendo eventualmente apresentar efeitos *off-target*. Além disso, vale ressaltar que a PKM2 pode ser inibida em várias células. Dados do nosso grupo descrevem que existe o aumento da expressão de PKM2 em neutrófilos e em células Th17 (Dados não publicados). Nesse sentido, utilizamos duas abordagens experimentais, nas quais excluem os efeitos *off-target* e não-seletivos do SKN: a deleção gênica da PKM2 *in vitro* em queratinócitos da linhagem HaCAT (Δ PKM2) e a utilização de animais nocautes condicionais para PKM2 em queratinócitos (K14-PKM2^{fl/+}).

Utilizamos a linhagem HaCAT- Δ PKM2 geradas pela tecnologia CRISPR-Cas9 e demonstramos um sucesso na deleção da PKM2. O uso da tecnologia de edição gênica CRISPR para o estudo da participação da PKM2 em

queratinócitos foi escolhida pelas vantagens inerentes dessa técnica quando comparada a outras estratégias. O silenciamento da expressão de proteínas-alvo por RNAs de interferências, por exemplo, apresenta limitações como instabilidade (podendo ser perdido após algumas gerações), silenciamento incompleto (*knockdown*) e interações fora do alvo, o que em alguns casos, pode impossibilitar a interpretação correta do fenótipo resultante (Boettcher & McManus, 2015; Gao et al., 2017). Ao contrário, o sistema CRISPR introduz mutações no genoma que são intrinsecamente estáveis e herdáveis por muitas gerações (Hilscher, Birkmayer, & Stoger, 2017).

Durante experimentos com a HaCAT- Δ PKM2 nós observamos que essas células apresentam menor taxa proliferativa e um tamanho menor, sugerindo uma alteração no citoesqueleto (dados não mostrados). De fato, autores demonstram que esses fenótipos contribuem para a função dos queratinócitos em responder a estímulos (Aronchik et al., 2003; Katsantonis et al., 1994; Pollard & Borisy, 2003). Observamos que a HaCAT- Δ PKM2 não respondeu ao estímulo com IMQ na produção de citocinas e, de maneira interessante, observamos que a expressão de IL-17R foi praticamente abolida com a ausência de PKM2. No entanto, não conseguimos realizar experimentos para avaliar os efeitos funcionais com a estimulação com IL-17A. Notáveis resultados de ensaios clínicos demonstram o efeito da inibição direta de IL-17R. Recentemente, o tratamento com o Brodalumabe, um anticorpo neutralizante do receptor para IL-17, foi aprovado pela FDA para tratamento de psoríase (Mease et al., 2014). O resultado que encontramos, sugere que ativação de IL-17R pode ter mecanismo dependente de PKM2.

No contexto de doença, utilizamos o modelo de psoríase induzida por

imiquimode em animais deficientes para PKM2 especificamente em queratinócitos. Como citado na seção de resultados desse trabalho, tivemos o insucesso na deleção total da PKM2 em queratinócitos para obtermos K14-PKM2^{fl/fl}. Nesse sentido, utilizamos o genótipo heterozigoto K14-PKM2^{fl/+} com intuito de acharmos algum fenótipo após indução da psoríase. De maneira interessante, observamos que animais K14-PKM2^{fl/+} apresentaram uma redução na expressão de PKM2 após indução de psoríase. Os genótipos K14-cre, PKM2^{fl/fl} e PKM2^{fl/+} mantiveram a expressão de PKM2 semelhante a animais WT.

Em animais K14-PKM2^{fl/+}, observamos a redução de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , TNF- α e da quimiocina KC após indução da psoríase por imiquimode. De maneira intrigante, observamos um aumento da produção de IL-23 e depois uma redução, contudo, a produção de IL-17 se manteve elevada durante os tempos analisado. O fenótipo observado é o mesmo que em animais deficientes para IL-17R utilizando o mesmo modelo (dados não mostrados) e em outros trabalhos na literatura utilizando outros modelos (Lasky et al., 2015; Nagata et al., 2008) . Esse conjunto de dados, sugere que a PKM2 é importante para expressão e sinalização do receptor de IL-17. Tem-se demonstrado que o receptor de IL-17 e sua via de sinalização contribui de maneira crítica para o desenvolvimento da psoríase e da inflamação de pele (Mazzon et al., 2011; Wu et al., 2015; Xu et al., 2018). Durante a psoríase por imiquimode animais deficientes para IL-17R apresentam uma menor doença (van der Fits et al., 2009), em contrapartida, em modelo de alergia cutânea é demonstrada um papel de manutenção da barreira protetora da pele (Lambert, Swindell, Tsoi, Stoll, & Elder, 2017) .

Recentemente, um estudo identificou a IL-25 (IL-17E) como sendo crítica

na inflamação da pele psoriásica. A ligação IL-25-IL-17RB apresenta-se como um circuito autoregulador em queratinócitos que amplifica e sustenta a inflamação crônica na psoríase. Os autores observaram alta expressão de IL-25 em pacientes com psoríase e a ausência de IL-25, utilizando animais K14-IL-25^{fl/fl}, em modelo de psoríase por imiquimode reduziu o desenvolvimento da doença via Act1, uma molécula adaptadora do receptor de IL-17(Xu et al., 2018). Outros autores identificaram um papel do Act1 contribuindo para proliferação de queratinócitos durante modelo de tumor de pele ou de injeção de IL-17A intradérmica (Wu et al., 2015).

Os animais K14-PKM2^{fl/+} não apresentaram diferença em comparação aos animais controle no peso ou em aparente função cognitiva. Durante a análise de diferentes conjuntos de células observamos uma redução do número de neutrófilos em animais K14-PKM2^{fl/+} o que corrobora a menor produção da quimiocina KC na pele. Além disso, esse dado corrobora com a menor produção de IL-8 em células HaCAT Δ PKM2. Observamos também redução de macrófagos inflamatórios na pele, no entanto, não observamos diferença no número e frequência nas células T $\alpha\beta$ e $\gamma\delta$ produtoras de IL-17, tanto na pele quanto em linfonodos (Dados não mostrados).

A psoríase é associada a importantes co-morbididades, como por exemplo, o risco de desenvolvimento de doenças cardiovascular (Gottlieb et al., 2008)r. A IL-17, por exemplo, contribui de maneira direta para o desenvolvimento de inflamação vascular e disfunção endotelial em psoríase experimental (Karch et al., 2014). Nesse sentido, analisamos amostras de aorta de animais em condição de experimentos com órgão isolado frente a concentrações de fenilefrina (efeito de contração vascular) e acetilcolina (efeito de relaxamento

vascular). Observamos que os animais K14-PKM2^{fl/+}, após indução de psoríase, apresentaram menor contração vascular e um efeito de relaxamento comparado aos animais controle, que apresentaram uma maior contração e um déficit no relaxamento vascular (Dados não mostrados). Autores, demonstram que a superexpressão dérmica de IL-17A induz disfunção endotelial sistêmica, estresse oxidativo vascular, hipertensão arterial, causada principalmente por neutrófilos. A redução desses fatores via IL-17A atenua o fenótipo vascular em camundongos K14-IL-17A^{ind/+}.

Outra co-morbidade associada com a psoríase são as doenças inflamatórias intestinais. Alguns autores relataram que 25% de pacientes com doença de Crohn ou colite ulcerativa são acometidos com psoríase (Eppinga et al., 2017). Nesse sentido, resolvemos avaliar de maneira simples e por curiosidade experimental a inflamação intestinal desses animais. Pela primeira vez, demonstramos que animais submetidos a modelo de psoríase apresentaram a redução do espessamento do cólon, um indicativo de inflamação intestinal. De maneira interessante, os animais K14-PKM2^{fl/+} submetidos a psoríase, não apresentaram a redução do tamanho do cólon (Dados não mostrados), ou seja, ocorreu uma proteção no acometimento da inflamação intestinal. Com os dois últimos dados relatados, podemos concluir que a PKM2 contribui para o desenvolvimento dos efeitos sistêmicos promovidos pela indução da psoríase.

A resposta inflamatória está associada a altas taxas energéticas das células que a orquestram. Este processo envolve uma mudança de estado metabólico basal para um estado altamente ativo, conhecido por glicólise aeróbica, que suporta o crescimento e diferenciação destas células e produção

de moléculas próinflamatórias (Heiden et al., 2009). Embora seja descrito um papel metabólico da PKM2 sob condições inflamatórias e no contexto tumoral, o foco deste trabalho foi tentar explorar efeitos não-metabólicos dessa enzima, no entanto, não descartamos que alterações metabólicas estejam contribuindo para a ativação de queratinócitos.

Em suma, nossos resultados demonstram, pela primeira vez e de maneira clara, a participação da enzima glicolítica PKM2 no desenvolvimento e manutenção da psoríase. A sua inibição farmacológica ou sua deleção gênica em queratinócitos, reduzem o surgimento de sinais característicos da doença e ativação dessas células, que são críticas para a patogênese da psoríase. Além disso, baseado em evidências e em dados obtidos nesse trabalho, podemos sugerir que a PKM2 participa, de alguma forma, na ativação ou sinalização do receptor de IL-17. Entretanto, é necessário conduzir investigações adicionais para desvendar os mecanismos exatos pelos quais a PKM2 regula positivamente a sinalização desse receptor e consequentemente o desenvolvimento da psoríase.

7. CONCLUSÃO

O conjunto de resultados apresentados nesse trabalho demonstram que a Piruvato Quinase M2 (PKM2) apresenta um papel crítico no desenvolvimento da psoríase (**Figura 26**). Foi evidenciado que o papel principal da PKM2 está no controle da ativação de queratinócitos pela IL-17A (**Figura 27**). Esses resultados, ainda, sugerem a PKM2 como um biomarcador para diagnóstico da psoríase, uma vez que observamos um aumento da expressão dessa enzima em amostras de pele, e consequentemente, um potencial alvo terapêutico para tratamento dessa doença e outras doenças inflamatórias.

Figura 26 – Representação esquemática da participação da PKM2 no desenvolvimento e manutenção da psoríase. Fatores associados ao desencadeamento da psoríase promovem um aumento de PKM2 em queratinócitos que liberaram mediadores inflamatórios como IL-8, IL-6, IL-1β, TNF-α e KC. Esses mediadores, por sua vez, são responsáveis pelo recrutamento e ativação de células como neutrófilos, células T γδ e células T αβ (Th17). Essas células T por sua vez, liberam IL-17 na pele que ativam os queratinócitos, dependente de PKM2, contribuindo para a manutenção da doença.

Figura 27 – Mecanismo molecular via PKM2 na ativação de queratinócitos durante a psoríase. A ativação do receptor de IL-17 promove um aumento da PKM2 em queratinócitos e esta contribui para ativação de mediadores que é responsável diretamente para o desenvolvimento da psoríase (**A**). A inibição da PKM2 resulta na menor expressão de IL-17R promovendo a menor liberação de mediadores associados a psoríase e consequentemente a redução da doença.

8. REFERÊNCIAS

Albanesi, C. (2012). Immunology of psoriasis. In *Clinical Immunology: Principles and Practice: Fourth Edition* (pp. 775–781). <https://doi.org/10.1016/B978-0-7234-3691-1.00077-5>

Almoussa, A. A., Morris, M., Fowler, S., Jones, J., & Alcorn, J. (2018). Elevation of serum pyruvate kinase M2 (PKM2) in IBD and its relationship to IBD indices. *Clinical Biochemistry*, 53, 19–24. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2017.12.007>

Alves-Filho, J. C., & P?lsson-McDermott, E. M. (2016). Pyruvate kinase M2: A potential target for regulating inflammation. *Frontiers in Immunology*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00145>

Anastasiou, D., Yu, Y., Israelsen, W. J., Jiang, J.-K., Boxer, M. B., Hong, B. S., ... Vander Heiden, M. G. (2012). Pyruvate kinase M2 activators promote tetramer formation and suppress tumorigenesis. *Nature Chemical Biology*, 8(10), 839–847. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1060>

Armstrong, A. W., Harskamp, C. T., Dhillon, J. S., & Armstrong, E. J. (2014). Psoriasis and smoking: A systematic review and meta-analysis. *British Journal of Dermatology*. <https://doi.org/10.1111/bjd.12670>

Aronchik, I., Behne, M. J., Leypoldt, L., Crumrine, D., Epstein, E., Ikeda, S., ... Mauro, T. (2003). Actin Reorganization Is Abnormal and Cellular ATP Is Decreased in Hailey-Hailey Keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology*,

121(4), 681–687. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2003.12472.x>

Bell, E. (2008). Dendritic cells: New DCs found deep in the skin. *Nature Reviews Immunology*, 8(2), 94. <https://doi.org/10.1038/nri2256>

Boehncke, W.-H., & Schön, M. P. (2015). Psoriasis. *The Lancet*, 386(9997), 983–994. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61909-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61909-7)

Boettcher, M., & McManus, M. T. (2015). Choosing the Right Tool for the Job: RNAi, TALEN, or CRISPR. *Molecular Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.04.028>

Brezinski, E. a, Dhillon, J. S., & Armstrong, A. W. (2015). Economic Burden of Psoriasis in the United States: A Systematic Review. *JAMA Dermatology*, 1–8. <https://doi.org/10.1001/jamadermatol.2014.3593>

Byrd, A. L., Belkaid, Y., & Segre, J. A. (2018). The human skin microbiome. *Nature Reviews Microbiology*. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.157>

Cai, Y., Shen, X., Ding, C., Qi, C., Li, K., Li, X., ... Yan, J. (2011). Pivotal role of dermal IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells in skin inflammation. *Immunity*, 35(4), 596–610. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.08.001>

Cassano, N., Vestita, M., Apruzzi, D., & Vena, G. A. (2011). Alcohol, psoriasis, liver disease, and anti-psoriasis drugs. *International Journal of Dermatology*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-4632.2011.05100.x>

Chen, J., Xie, J., Jiang, Z., Wang, B., Wang, Y., & Hu, X. (2011). Shikonin and its analogs inhibit cancer cell glycolysis by targeting tumor pyruvate kinase-M2. *Oncogene*, 30(42), 4297–4306. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.137>

Chen, L., & Tsai, T. F. (2018). HLA-Cw6 and psoriasis. *British Journal of Dermatology*. <https://doi.org/10.1111/bjd.16083>

Chien, Y., Meyer, C., & Bonneville, M. (2014). $\gamma\delta$ T Cells: First Line of Defense and Beyond. *Annual Review of Immunology*, 32(1), 121–155. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120216>

Chiricozzi, A., Guttman-Yassky, E., Suárez-Farías, M., Nograles, K. E., Tian, S., Cardinale, I., ... Krueger, J. G. (2011). Integrative responses to IL-17 and TNF- α in human keratinocytes account for key inflammatory pathogenic circuits in psoriasis. *Journal of Investigative Dermatology*, 131(3), 677–687. <https://doi.org/10.1038/jid.2010.340>

Cho, K. A., Suh, J. W., Ho Lee, K., Kang, J. L., & Woo, S. Y. (2012). IL-17 and IL-22 enhance skin inflammation by stimulating the secretion of il-1 β by keratinocytes via the ROS-NLRP3-caspase-1 pathway. *International Immunology*, 24(3), 147–158. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxr110>

Christofk, H. R., Vander Heiden, M. G., Wu, N., Asara, J. M., & Cantley, L. C. (2008). Pyruvate kinase M2 is a phosphotyrosine-binding protein. *Nature*, 452(7184), 181–186. <https://doi.org/10.1038/nature06667>

Coimbra, S., Figueiredo, A., Castro, E., Rocha-Pereira, P., & Santos-Silva, A. (2012). The roles of cells and cytokines in the pathogenesis of psoriasis. *International Journal of Dermatology*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-4632.2011.05154.x>

Croxford, A. L., Karbach, S., Kurschus, F. C., Wörtge, S., Nikolaev, A., Yogev, N., ... Waisman, A. (2014). IL-6 regulates neutrophil microabscess formation in IL-17A-driven psoriasiform lesions. *Journal of Investigative Dermatology*, 134(3), 728–735. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.404>

Cumberbatch, M., Singh, M., Dearman, R. J., Young, H. S., Kimber, I., & Griffiths, C. E. M. (2006). Impaired Langerhans cell migration in psoriasis. *The Journal of Experimental Medicine*, 203(4), 953–960. <https://doi.org/10.1084/jem.20052367>

Di Cesare, A., Di Meglio, P., & Nestle, F. O. (2009). The IL-23/Th17 axis in the immunopathogenesis of psoriasis. *The Journal of Investigative Dermatology*, 129(6), 1339–1350. <https://doi.org/10.1038/jid.2009.59>

Di Meglio, P., & Nestle, F. O. (2017). Immunopathogenesis of psoriasis. In *Clinical and Basic Immunodermatology: Second Edition* (pp. 373–395).
https://doi.org/10.1007/978-3-319-29785-9_21

Dolgin, E. (2016). New anti-IL-23 drugs raise hopes for psoriasis plaque clearance. *Nature Biotechnology*, 34(12), 1218–1219.
<https://doi.org/10.1038/nbt1216-1218>

Donn, R. P., Plant, D., Jury, F., Richards, H. L., Worthington, J., Ray, D. W., & Griffiths, C. E. (2004). Macrophage migration inhibitory factor gene polymorphism is associated with psoriasis. *J Invest Dermatol*, 123(3), 484–487.
<https://doi.org/10.1111/j.0022-202X.2004.23314.x> \rJID23314 [pii]

Eckert, R. L., & Rorke, E. A. (1989). Molecular biology of keratinocyte differentiation. *Environmental Health Perspectives*.
<https://doi.org/10.1289/ehp.8980109>

Elloso, M. M., Gomez-Angelats, M., & Fourie, A. M. (2012). Targeting the Th17 pathway in psoriasis. *Journal of Leukocyte Biology*, 92(December), 1187–1197.
<https://doi.org/10.1189/jlb.0212101>

Eppinga, H., Poortinga, S., Thio, H. B., Nijsten, T. E. C., Nuij, V. J. A. A., Van Der Woude, C. J., ... Peppelenbosch, M. P. (2017). Prevalence and Phenotype of Concurrent Psoriasis and Inflammatory Bowel Disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, 23(10), 1783–1789. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000001169>

Fry, L., & Baker, B. S. (2007). Triggering psoriasis: the role of infections and medications. *Clinics in Dermatology*, 25(6), 606–615. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2007.08.015>

Fuentes-Duculan, J., Suárez-Farías, M., Zaba, L. C., Nograles, K. E., Pierson, K. C., Mitsui, H., ... Lowes, M. A. (2010). A subpopulation of CD163-positive macrophages is classically activated in psoriasis. *Journal of Investigative Dermatology*, 130(10), 2412–2422. <https://doi.org/10.1038/jid.2010.165>

Gao, W., Long, L., Tian, X., Xu, F., Liu, J., Singh, P. K., ... Song, C. (2017). Genome Editing in Cotton with the CRISPR/Cas9 System. *Frontiers in Plant Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01364>

Gautier, L., Cope, L., Bolstad, B. M., & Irizarry, R. A. (2004). Affy - Analysis of Affymetrix GeneChip data at the probe level. *Bioinformatics*, 20(3), 307–315. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg405>

Gilliet, M., & Lande, R. (2008). Antimicrobial peptides and self-DNA in autoimmune skin inflammation. *Current Opinion in Immunology*. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2008.06.008>

Giustizieri, M. L., Mascia, F., Frezzolini, A., De Pità, O., Chinni, L. M., Giannetti, A., ... Pastore, S. (2001). Keratinocytes from patients with atopic dermatitis and psoriasis show a distinct chemokine production profile in response to T cell-

derived cytokines. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 107(5 SUPPL.), 871–877. <https://doi.org/10.1067/mai.2001.114707>

Gottlieb, A. B., Chao, C., & Dann, F. (2008). Psoriasis comorbidities. *Journal of Dermatological Treatment*. <https://doi.org/10.1080/09546630701364768>

Greb, J. E., Goldminz, A. M., Elder, J. T., Lebwohl, M. G., Gladman, D. D., Wu, J. J., ... Gottlieb, A. B. (2016). Psoriasis. *Nature Reviews Disease Primers*, 2. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.82>

Griffiths, C. E. M. C., & Barker, J. J. N. W. N. (2007). Pathogenesis and clinical features of psoriasis. *The Lancet*, 370(9583), 263–271. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)61128-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)61128-3)

Griffiths, C. E. M., Christophers, E., Barker, J. N. W. N., Chalmers, R. J. G., Chimenti, S., Krueger, G. G., ... Fry, L. (2007). A classification of psoriasis vulgaris according to phenotype. In *British Journal of Dermatology* (Vol. 156, pp. 258–262). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2006.07675.x>

Griffiths, C. E. M., Strober, B. E., van de Kerkhof, P., Ho, V., Fidelus-Gort, R., Yeilding, N., ... Menter, A. (2010). Comparison of Ustekinumab and Etanercept for Moderate-to-Severe Psoriasis. *New England Journal of Medicine*, 362(2), 118–128. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0810652>

Gudjonsson, J. E., & Elder, J. T. (2007). Psoriasis: epidemiology. *Clinics in Dermatology*, 25(6), 535–546. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2007.08.007>

Gudjonsson, J. E., Thorarinsson, A. M., Sigurgeirsson, B., Kristinsson, K. G., & Valdimarsson, H. (2003). Streptococcal throat infections and exacerbation of chronic plaque psoriasis: A prospective study. *British Journal of Dermatology*, 149(3), 530–534. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2133.2003.05552.x>

Hammond, M. E., Lapointe, G. R., Feucht, P. H., Hilt, S., Gallegos, C. a, Gordon, C. a, ... Tekamp-Olson, P. (1995). IL-8 induces neutrophil chemotaxis predominantly via type I IL-8 receptors. *J Immunol*, 155(3), 1428–1433.

Heiden, M. G. Vander, Cantley, L. C., & Thompson, C. B. (2009). Understanding the warburg effect: The metabolic requirements of cell proliferation. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1160809>

Henry, C. M., Sullivan, G. P., Clancy, D. M., Afonina, I. S., Kulms, D., & Martin, S. J. (2016). Neutrophil-Derived Proteases Escalate Inflammation through Activation of IL-36 Family Cytokines. *Cell Reports*, 14(4), 708–722. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.12.072>

Hilscher, J., B̈irstmayr, H., & Stoger, E. (2017). Targeted modification of plant genomes for precision crop breeding. *Biotechnology Journal*. <https://doi.org/10.1002/biot.201600173>

Hui, S., Ghergurovich, J. M., Morscher, R. J., Jang, C., Teng, X., Lu, W., ... Rabinowitz, J. D. (2017). Glucose feeds the TCA cycle via circulating lactate. *Nature*, 551(7678), 115–118. <https://doi.org/10.1038/nature24057>

Ikeda, S., Takahashi, H., Suga, Y., Eto, H., Etoh, T., Okuma, K., ... Kanekura, T. (2013). Therapeutic depletion of myeloid lineage leukocytes in patients with generalized pustular psoriasis indicates a major role for neutrophils in the immunopathogenesis of psoriasis. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 68(4), 609–617. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2012.09.037>

Jensen, P., & Skov, L. (2017). Psoriasis and Obesity. *Dermatology*. <https://doi.org/10.1159/000455840>

Juráňová, J., Franková, J., & Ulrichová, J. (2017). The role of keratinocytes in inflammation. *Journal of Applied Biomedicine*. <https://doi.org/10.1016/j.jab.2017.05.003>

Jurica, M. S., Mesecar, A., Heath, P. J., Shi, W., Nowak, T., & Stoddard, B. L. (1998). The allosteric regulation of pyruvate kinase by fructose-1,6-bisphosphate. *Structure (London, England : 1993)*, 6, 195–210. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(98\)00021-5](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(98)00021-5)

Karbach, S., Croxford, A. L., Oelze, M., Schöler, R., Minwegen, D., Wegner, J., ... Münzel, T. (2014). Interleukin 17 drives vascular inflammation, endothelial dysfunction, and arterial hypertension in psoriasis-like skin disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 34(12), 2658–2668. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.114.304108>

Katsantonis, J., Tosca, A., Koukouritaki, S. B., Theodoropoulos, P. A., Gravanis, A., & Stournaras, C. (1994). Differences in the G/total actin ratio and microfilament stability between normal and malignant human keratinocytes. *Cell Biochemistry and Function*, 12(4), 267–274. <https://doi.org/10.1002/cbf.290120407>

Kim, J. H., Hu, Y., Yongqing, T., Kim, J., Hughes, V. A., Le Nours, J., ... Winau, F. (2016). CD1a on Langerhans cells controls inflammatory skin disease. *Nature Immunology*, 17(10), 1159–1166. <https://doi.org/10.1038/ni.3523>

Kim, J. W., Tchernyshyov, I., Semenza, G. L., & Dang, C. V. (2006). HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: A metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metabolism*, 3(3), 177–185. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.02.002>

Kjær, T. N., Thorsen, K., Jessen, N., Stenderup, K., & Pedersen, S. B. (2015). Resveratrol ameliorates imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice. *PLoS ONE*, 10(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126599>

Kolaczowska, E., & Kubes, P. (2013). Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature Reviews Immunology*.
<https://doi.org/10.1038/nri3399>

Koopman, W. J. H., Distelmaier, F., Smeitink, J. A. M., Willems, P. H. G. M., Aanerud, J., Borghammer, P., ... Sedensky, M. (2013). OXPHOS mutations and neurodegeneration. *The EMBO Journal*, 32(1), 9–29.
<https://doi.org/10.1038/emboj.2012.300>

Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M., & Kuchroo, V. K. (2009). IL-17 and Th17 Cells. *Annual Review of Immunology*, 27(1), 485–517.
<https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132710>

Lambert, S., Swindell, W. R., Tsoi, L. C., Stoll, S. W., & Elder, J. T. (2017). Dual Role of Act1 in Keratinocyte Differentiation and Host Defense: TRAF3IP2 Silencing Alters Keratinocyte Differentiation and Inhibits IL-17 Responses. *Journal of Investigative Dermatology*, 137(7), 1501–1511.
<https://doi.org/10.1016/j.jid.2016.12.032>

Lande, R., Gregorio, J., Facchinetti, V., Chatterjee, B., Wang, Y.-H., Homey, B., ... Gilliet, M. (2007). Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature*, 449(7162), 564–569.
<https://doi.org/10.1038/nature06116>

Langley, R. G., Elewski, B. E., Lebwohl, M., Reich, K., Griffiths, C. E. M., Papp, K., ... Papavassilis, C. (2014). Secukinumab in plaque psoriasis--results of two phase 3 trials. *The New England Journal of Medicine*, 371(4), 326–338. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1314258>

Lasky, C. E., Jamison, K. E., Sidelinger, D. R., Pratt, C. L., Zhang, G., & Brown, C. R. (2015). Infection of interleukin 17 receptor a-deficient C3H mice with *Borrelia burgdorferi* does not affect their development of Lyme arthritis and carditis. *Infection and Immunity*, 83(7), 2882–2888. <https://doi.org/10.1128/IAI.00533-15>

Leek, J. T., & Storey, J. D. (2007). Capturing heterogeneity in gene expression studies by surrogate variable analysis. *PLoS Genetics*, 3(9), 1724–1735. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0030161>

Leek, J. T., & Storey, J. D. (2008). A general framework for multiple testing dependence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(48), 18718–18723. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808709105>

Leonardi, C. L., Powers, J. L., Matheson, R. T., Goffe, B. S., Zitnik, R., Wang, A., & Gottlieb, A. B. (2003). Etanercept as monotherapy in patients with psoriasis. *The New England Journal of Medicine*, 349(21), 2014–2022. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa030409>

Li, Q., Zhang, D., Chen, X., He, L., Li, T., Xu, X., & Li, M. (2015). Nuclear PKM2 contributes to gefitinib resistance via upregulation of STAT3 activation in colorectal cancer. *Scientific Reports*, 5. <https://doi.org/10.1038/srep16082>

Lowes, M. A., Kikuchi, T., Fuentes-Duculan, J., Cardinale, I., Zaba, L. C., Haider, A. S., ... Krueger, J. G. (2008). Psoriasis vulgaris lesions contain discrete populations of Th1 and Th17 T cells. *Journal of Investigative Dermatology*, 128(5), 1207–1211. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5701213>

Lowes, M. A., Russell, C. B., Martin, D. A., Towne, J. E., & Krueger, J. G. (2013). The IL-23/T17 pathogenic axis in psoriasis is amplified by keratinocyte responses. *Trends in Immunology*. <https://doi.org/10.1016/j.it.2012.11.005>

Lowes, M. a, Bowcock, A. M., & Krueger, J. G. (2007). Pathogenesis and therapy of psoriasis. *Nature*, 445(7130), 866–873. <https://doi.org/10.1038/nature05663>

Malissen, B., Tamoutounour, S., & Henri, S. (2014). The origins and functions of dendritic cells and macrophages in the skin. *Nature Reviews Immunology*. <https://doi.org/10.1038/nri3683>

Mamkin, I., Mamkin, A., & Ramanan, S. V. (2007). HIV-associated psoriasis. *Lancet Infectious Diseases*. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(07\)70161-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(07)70161-5)

May, M. J. (2011). IL-17R signaling: New players get in on the Act1. *Nature Immunology*, 12(9), 813–815. <https://doi.org/10.1038/ni.2093>

Mazurek, S. (2011). Pyruvate kinase type M2: a key regulator of the metabolic budget system in tumor cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 43(7), 969–980. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2010.02.005>

Mazzon, E., Esposito, E., Impellizzeri, D., Di Paola, R., Melani, A., Bramanti, P., ... Cuzzocrea, S. (2011). CGS 21680, an agonist of the adenosine (A2A) receptor, reduces progression of murine type II collagen-induced arthritis. *The Journal of Rheumatology*, 38(10), 2119–2129. <https://doi.org/10.3899/jrheum.110111>

Mease, P. J., Genovese, M. C., Greenwald, M. W., Ritchlin, C. T., Beaulieu, A. D., Deodhar, A., ... Nirula, A. (2014). Brodalumab, an Anti-IL17RA Monoclonal Antibody, in Psoriatic Arthritis. *New England Journal of Medicine*, 370(24), 2295–2306. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1315231>

Morgan, H. P., O'Reilly, F. J., Wear, M. a, O'Neill, J. R., Fothergill-Gilmore, L. a, Hupp, T., & Walkinshaw, M. D. (2013). M2 pyruvate kinase provides a mechanism for nutrient sensing and regulation of cell proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(15), 5881–5886. <https://doi.org/10.1073/pnas.1217157110>

Morimura, S., Oka, T., Sugaya, M., & Sato, S. (2016). CX3CR1 deficiency attenuates imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation with decreased M1 macrophages. *Journal of Dermatological Science*, 82(3), 175–188. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2016.03.004>

Nagata, T., McKinley, L., Peschon, J. J., Alcorn, J. F., Aujla, S. J., & Kolls, J. K. (2008). Requirement of IL-17RA in Con A induced hepatitis and negative regulation of IL-17 production in mouse T cells. *Journal of Immunology*, 181, 7473–7479. <https://doi.org/10.1016/j.jimlet.2012.01.013> [pii]

Németh, T., & Mócsai, A. (2012). The role of neutrophils in autoimmune diseases. *Immunology Letters*, 143(1), 9–19. <https://doi.org/10.1016/j.jimlet.2012.01.013>

Nestle, F. O., Conrad, C., Tun-Kyi, A., Homey, B., Gombert, M., Boyman, O., ... Gilliet, M. (2005). Plasmacytoid dendritic cells initiate psoriasis through interferon- α production. *J Exp Med*, 202(1), 135–143. <https://doi.org/10.1084/jem.20050500>

Nickoloff, B. J., & Nestle, F. O. (2004). Science in medicine Recent insights into the immunopathogenesis of psoriasis provide new therapeutic opportunities, 113(12). <https://doi.org/10.1172/JCI200422147>.The

Nogales, K. E., Zaba, L. C., Guttman-Yassky, E., Fuentes-Duculan, J., Suárez-Fariñas, M., Cardinale, I., ... Krueger, J. G. (2008). Th17 cytokines interleukin (IL)-17 and IL-22 modulate distinct inflammatory and keratinocyte-response pathways. *British Journal of Dermatology*, 159(5), 1092–1102.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2008.08769.x>

O'Neill, L. A. J., Kishton, R. J., & Rathmell, J. (2016). A guide to immunometabolism for immunologists. *Nature Reviews Immunology*. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.70>

Palsson-McDermott, E. M., Curtis, A. M., Goel, G., Lauterbach, M. A. R., Sheedy, F. J., Gleeson, L. E., ... O'Neill, L. A. J. (2015). Pyruvate Kinase M2 Regulates Hif-1 α Activity and IL-1 β Induction and Is a Critical Determinant of the Warburg Effect in LPS-Activated Macrophages. *Cell Metabolism*, 21(1), 65–80. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.12.005>

Parisi, R., Symmons, D. P. M., Griffiths, C. E. M., & Ashcroft, D. M. (2013). Global epidemiology of psoriasis: a systematic review of incidence and prevalence. *The Journal of Investigative Dermatology*, 133(2), 377–385. <https://doi.org/10.1038/jid.2012.339>

Perera, G. K., Di Meglio, P., & Nestle, F. O. (2012). Psoriasis. *Annual Review of Pathology*, 7, 385–422. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-011811-132448>

Pollard, T. D., & Borisy, G. G. (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00120-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00120-X)

Reinecke, F., Smeitink, J. a M., & van der Westhuizen, F. H. (2009). OXPHOS gene expression and control in mitochondrial disorders. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1792(12), 1113–1121. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2009.04.003>

Roberson, E. D. O., & Bowcock, A. M. (2010). Psoriasis genetics: Breaking the barrier. *Trends in Genetics*. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2010.06.006>

Romiti, R., Amone, M., Menter, A., & Miot, H. A. (2017). Prevalence of psoriasis in Brazil – a geographical survey. *International Journal of Dermatology*. <https://doi.org/10.1111/ijd.13604>

Rongioletti, F., Fiorucci, C., & Parodi, A. (2009). Psoriasis induced or aggravated by drugs. In *Journal of Rheumatology* (Vol. 36, pp. 59–61). <https://doi.org/10.3899/jrheum.090227>

Rosenblum, M. D., Remedios, K. A., & Abbas, A. K. (2015). Mechanisms of human autoimmunity. *Journal of Clinical Investigation*, 125(6), 2228–2233. <https://doi.org/10.1172/JCI78088>

Semba, H., Takeda, N., Isagawa, T., Sugiura, Y., Honda, K., Wake, M., ... Komuro, I. (2016). HIF-1 α -PDK1 axis-induced active glycolysis plays an essential role in macrophage migratory capacity. *Nature Communications*, 7. <https://doi.org/10.1038/ncomms11635>

Semenova, G., & Chernoff, J. (2012). PKM2 enters the morpheein academy. *Molecular Cell*, 45(5), 583–584. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.02.014>

Shah, P. P., Desai, P. R., Patel, A. R., & Singh, M. S. (2012). Skin permeating nanogel for the cutaneous co-delivery of two anti-inflammatory drugs. *Biomaterials*, 33(5), 1607–1617. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.11.011>

Shi, L. Z., Wang, R., Huang, G., Vogel, P., Neale, G., Green, D. R., & Chi, H. (2011). HIF1alpha-dependent glycolytic pathway orchestrates a metabolic checkpoint for the differentiation of TH17 and Treg cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 208(7), 1367–1376. <https://doi.org/10.1084/jem.20110278>

Shi, X., Jin, L., Dang, E., Chang, T., Feng, Z., Liu, Y., & Wang, G. (2011). IL-17A upregulates keratin 17 expression in keratinocytes through STAT1-and STAT3-dependent mechanisms. *Journal of Investigative Dermatology*, 131(12), 2401–2408. <https://doi.org/10.1038/jid.2011.222>

Shirai, T., Nazarewicz, R. R., Wallis, B. B., Yanes, R. E., Watanabe, R., Hilhorst, M., ... Weyand, C. M. (2016). The glycolytic enzyme PKM2 bridges metabolic and inflammatory dysfunction in coronary artery disease. *The Journal of Experimental Medicine*, 213(3), 337–354. <https://doi.org/10.1084/jem.20150900>

Shirakata, Y. (2010). Regulation of epidermal keratinocytes by growth factors. *Journal of Dermatological Science*.
<https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2010.05.002>

Sotiropoulou, P. A., & Blanpain, C. (2012). Development and homeostasis of the skin epidermis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(7), 1–9.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008383>

Sumida, H., Yanagida, K., Kita, Y., Abe, J., Matsushima, K., Nakamura, M., ... Shimizu, T. (2014). Interplay between CXCR2 and BLT1 Facilitates Neutrophil Infiltration and Resultant Keratinocyte Activation in a Murine Model of Imiquimod-Induced Psoriasis. *The Journal of Immunology*, 192(9), 4361–4369.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302959>

Sun, J., Zhao, Y., & Hu, J. (2013). Curcumin Inhibits Imiquimod-Induced Psoriasis-Like Inflammation by Inhibiting IL-1beta and IL-6 Production in Mice, 8(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067078>

Sun, Q., Chen, X., Ma, J., Peng, H., Wang, F., Zha, X., ... Zhang, H. (2011). Mammalian target of rapamycin up-regulation of pyruvate kinase isoenzyme type M2 is critical for aerobic glycolysis and tumor growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(10), 4129–4134.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1014769108>

Tonel, G., & Conrad, C. (2009). Interplay between keratinocytes and immune cells-Recent insights into psoriasis pathogenesis. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2008.10.022>

Tonello, S., Rizzi, M., Migliario, M., Rocchetti, V., & Renò, F. (2017). Low concentrations of neutrophil extracellular traps induce proliferation in human keratinocytes via NF-kB activation. *Journal of Dermatological Science*, 88(1), 110–116. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2017.05.010>

Torii, K., Saito, C., Furuhashi, T., Nishioka, A., Shintani, Y., Kawashima, K., ... Morita, A. (2011). Tobacco smoke is related to Th17 generation with clinical implications for psoriasis patients. *Experimental Dermatology*. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2010.01224.x>

Tsai, Y. C., & Tsai, T. F. (2017). Anti-interleukin and interleukin therapies for psoriasis: current evidence and clinical usefulness. *Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease*. <https://doi.org/10.1177/1759720X17735756>

van der Fits, L., Mourits, S., Voerman, J. S. a, Kant, M., Boon, L., Laman, J. D., ... Lubberts, E. (2009). Imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice is mediated via the IL-23/IL-17 axis. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 182(9), 5836–5845. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0802999>

Vanden Eijnden, S., Goriely, S., De Wit, D., Goldman, M., & Willems, F. (2006). Preferential production of the IL-12(p40)/IL-23(p19) heterodimer by dendritic cells

from human newborns. *European Journal of Immunology*, 36(1), 21–26.
<https://doi.org/10.1002/eji.200535467>

Wang, H.-J., Hsieh, Y.-J., Cheng, W.-C., Lin, C.-P., Lin, Y., Yang, S.-F., ... Wang, W.-C. (2014). JMJD5 regulates PKM2 nuclear translocation and reprograms HIF-1 α -mediated glucose metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(1), 279–284.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1311249111>

Warburg, O. (1956). Injuring of Respiration the Origin of Cancer Cells. *Science*, 123(3191), 309–314. <https://doi.org/10.1126/science.123.3191.309>

Wen, H., Ting, J. P.-Y., & O'Neill, L. a J. (2012). A role for the NLRP3 inflammasome in metabolic diseases—did Warburg miss inflammation? *Nature Immunology*, 13(4), 352–357. <https://doi.org/10.1038/ni.2228>

Works, M. G., Yin, F., Yin, C. C., Shew, K., Tran, T., Dunlap, N., ... Andrea, A. D. (2015). Inhibition of TYK2 and JAK1 Ameliorates Imiquimod-Induced Psoriasis-like Dermatitis by Inhibiting IL-22 and the IL-23/IL-17 Axis. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400205>

Wu, L., Chen, X., Zhao, J., Martin, B., Zepp, J. A., Ko, J. S., ... Li, X. (2015). A novel IL-17 signaling pathway controlling keratinocyte proliferation and tumorigenesis via the TRAF4–ERK5 axis. *The Journal of Experimental Medicine*, 212(10), 1571–1587. <https://doi.org/10.1084/jem.20150204>

Xiao, W., Sarsour, E. H., Wagner, B. A., Doskey, C. M., Buettner, G. R., Domann, F. E., & Goswami, P. C. (2014). Succinate dehydrogenase activity regulates PCB3 - quinone - induced metabolic oxidative stress and toxicity in HaCaT human keratinocytes. <https://doi.org/10.1007/s00204-014-1407-3>

Xie, M., Yu, Y., Kang, R., Zhu, S., Yang, L., Zeng, L., ... Tang, D. (2016). PKM2-Dependent glycolysis promotes NLRP3 and AIM2 inflammasome activation. *Nature Communications*, 7. <https://doi.org/10.1038/ncomms13280>

Xu, M., Lu, H., Lee, Y.-H., Wu, Y., Liu, K., Shi, Y., ... Dong, C. (2018). An Interleukin-25-Mediated Autoregulatory Circuit in Keratinocytes Plays a Pivotal Role in Psoriatic Skin Inflammation. *Immunity*, 0(0), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.03.019>

Yang, L., Xie, M., Yang, M., Yu, Y., Zhu, S., Hou, W., ... Tang, D. (2014). PKM2 regulates the Warburg effect and promotes HMGB1 release in sepsis. *Nature Communications*, 5, 4436. <https://doi.org/10.1038/ncomms5436>

Yang, R., Zhou, Q., Wen, C., Hu, J., Li, H., & Zhao, M. (2013). Mustard seed (*Sinapis Alba Linn*) attenuates imiquimod- induced psoriasiform inflammation of BALB / c mice, (January), 543–552. <https://doi.org/10.1111/1346-8138.12119>

Yang, W., & Lu, Z. (2013). Nuclear PKM2 regulates the Warburg effect. *Cell Cycle*. <https://doi.org/10.4161/cc.26182>

Yawalkar, N., Tschärner, G. G., Hunger, R. E., & Hassan, A. S. (2009). Increased expression of IL-12p70 and IL-23 by multiple dendritic cell and macrophage subsets in plaque psoriasis. *Journal of Dermatological Science*, 54(2), 99–105. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2009.01.003>

Yoshizumi, M., Nakamura, T., Kato, M., Ishioka, T., Kozawa, K., Wakamatsu, K., & Kimura, H. (2008). Release of cytokines/chemokines and cell death in UVB-irradiated human keratinocytes, HaCaT. *Cell Biology International*, 32(11), 1405–1411. <https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2008.08.011>

Zaba, L. C., Krueger, J. G., & Lowes, M. A. (2009). Resident and “inflammatory” dendritic cells in human skin. *The Journal of Investigative Dermatology*, 129(2), 302–308. <https://doi.org/10.1038/jid.2008.225>

Zheng, Y., Danilenko, D. M., Valdez, P., Kasman, I., Eastham-Anderson, J., Wu, J., & Ouyang, W. (2007). Interleukin-22, a TH17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis. *Nature*, 445(7128), 648–651. <https://doi.org/10.1038/nature05505>

Zhu, S., Pan, W., Shi, P., Gao, H., Zhao, F., Song, X., ... Qian, Y. (2010). Modulation of experimental autoimmune encephalomyelitis through TRAF3-mediated suppression of interleukin 17 receptor signaling. *The Journal of Experimental Medicine*, 207(12), 2647–2662. <https://doi.org/10.1084/jem.20100703>

9. ANEXOS

ANEXO A – CERTIFICAÇÃO DE UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS EM EXPERIMENTAÇÃO

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 167/2015, sobre o projeto intitulado “*Participação da piruvato quinase M2 (PKM2) na patogênese da psoríase*”, sob a responsabilidade do **Professor Doutor José Carlos Farias Alves Filho** está de acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** em reunião de 27 de janeiro de 2016.

We certify that the protocol nº 167/2015, entitled “*Role of pyruvate kinase M2 (PKM2) on the pathogenesis of psoriasis*”, is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from the Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in 01/27/2016.

Ribeirão Preto, 27 de janeiro de 2016.

Prof. Dr. Fernando Silva Ramalho
Presidente da CEUA – FMRP – USP

Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – (16)3315-3301